



**Bedeutung von Fibronektin Spleißvarianten für die  
Migration primärer Colon lamina propria Fibroblasten bei  
unterschiedlichen klinischen Subtypen von Morbus Crohn**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER  
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER  
NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III – BIOLOGIE UND VORKLINISCHE  
MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Julia Brenmoehl aus Neu Broderstorf

Februar 2007

Promotionsgesuch eingereicht am:

07. Februar 2007

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. med. Dr. phil. G. Rogler

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. C. Aslanidis

Prof. Dr. Dr. G. Rogler

Prof. Dr. R. Warth

Meinen Eltern

## Abkürzungen

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
β-ME	β-Mercaptoethanol
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchinonsäure
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CLPF	Colon lamina propria Fibroblasten
CU	Colitis Ulcerosa
d	Tage
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid, Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<u>f</u> luorescence <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orting
FCS	<u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum, Fötales Kälberserum
FN	Fibronectin
FN ED-A	Fibronectin Extra Domäne A
FN ED-B	Fibronectin Extra Domäne B
FN IIIcS	Fibronectin Typ III <i>connecting segment</i>

h	Stunde(n)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
kDa	Kilo-Dalton
Ko	Kontrolle
MC	Morbus Crohn
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF-AB	<i>platelet derived growth factor-AB</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$ 1	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math>1</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
üN	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
z.B.	zum Beispiel

## **Gliederung**

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Aufbau der Darmwand .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3 Mögliche Komplikationen und extraintestinale Manifestationen bei         MC und CU.....</b>	<b>16</b>
1.3.1 Gestörte Wundheilung und Bildung von Fisteln .....	17
1.3.2 Überschießende Wundheilung und Entstehung von Stenosen.....	19
<b>1.4 Migration von Fibroblasten und Myofibroblasten.....</b>	<b>21</b>
<b>1.5 Morphologie sich bewegender Fibroblasten: Mikrospikes und         Lamellipodien.....</b>	<b>23</b>
<b>1.6 Die Migration von humanen Zellen ist Aktin-abhängig .....</b>	<b>25</b>
<b>1.7 Die Rolle der <i>Focal Adhesion Kinase</i> (FAK) bei der Zellmigration ..</b>	<b>28</b>
<b>1.8 Fibronektin, Wachstumsfaktoren und Zytokine und deren         Bedeutung für die Zellmigration .....</b>	<b>31</b>
1.8.1 Fibronektin .....	31
1.8.2 Integrine.....	33
1.8.3 Wachstumsfaktoren und Zytokine .....	35
1.8.3.1 <i>Transforming Growth Factor (TGF-<math>\beta</math>)</i> .....	36
1.8.3.2 <i>Tumor Nekrose-Faktor und Interferon-<math>\gamma</math></i> .....	38
1.8.3.3 <i>Platelet Derived Growth Factor</i> .....	39
<b>1.9 Bisherige Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
<b>2. Arbeitsziele.....</b>	<b>43</b>
<b>3. Materialien .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1. Chemikalien und Kits.....</b>	<b>47</b>

3.1.1. Zellkultur .....	47
3.1.1.1 Zytokine, Wachstumsfaktoren .....	48
3.1.1.2 Kit .....	48
3.1.2 Immunhistochemie.....	48
3.1.2.1 Antikörper .....	48
3.1.2.2 Isotypkontrollen .....	49
3.1.3 Durchflusszytometrie (FACS) .....	49
3.1.3.1 Antikörper .....	49
3.1.3.2 Isotypkontrollen .....	49
3.1.4 RNA-Prozedur .....	49
3.1.4.1 RNA-Isolation .....	49
3.1.4.2 RT-PCR.....	49
3.1.4.3 Primer und Sonden.....	50
3.1.4.4 Polymerasen.....	50
3.1.5 SDS-PAGE und Western Blot.....	50
3.1.5.1 RIPA-Lysepuffer .....	50
3.1.5.2 Proteinbestimmung.....	51
3.1.5.3 Größenstandard .....	51
3.1.5.4 SDS-PAGE Gele .....	51
3.1.5.5 Running-Puffer .....	51
3.1.5.6 Transfer-Puffer .....	51
3.1.5.7 Wasch-Puffer.....	52
3.1.5.8 Detektion .....	52
3.1.5.9 Stripping .....	52
<b>3.2 sonstige Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>52</b>
<b>3.3 Geräte .....</b>	<b>53</b>
<b>3.4 Software .....</b>	<b>54</b>
<b>4. Methoden.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1 Isolierung, Lagerung und Kultur von primären humanen Colon         lamina propria Fibroblasten (CLPF).....</b>	<b>55</b>
4.1.1 Isolierung und Kultivierung von CLPF.....	55
4.1.2 Einfrieren der CLPF .....	57
4.1.3 Auftauen der Zellen .....	58

4.1.4 Zellzahlbestimmung.....	58
<b>4.2 Herstellung von konditionierten Medien.....</b>	<b>59</b>
<b>4.3 Migrationsassay .....</b>	<b>60</b>
4.3.1 Allgemeines zur Methode .....	60
4.3.2 Beschreibung der Technik .....	60
4.3.2 Färben der migrierten Zellen auf der Membran .....	61
<b>4.4 Stimulation von CLPF mit IFN-<math>\gamma</math>, TNF und TGF-<math>\beta</math>1 .....</b>	<b>62</b>
4.4.1 Stimulation mit IFN- $\gamma$ , TNF und TGF- $\beta$ 1.....	62
4.4.2 Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 .....	63
4.4.3 Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 und PDGF-AB (Verwundungsassay) .....	63
<b>4.5 RNA-Isolation.....</b>	<b>64</b>
<b>4.6. Photometrische Bestimmung des RNA-Gehalts .....</b>	<b>66</b>
4.6.1 Allgemeines zur Methode .....	66
4.6.2 Beschreibung der Technik .....	66
<b>4.7 cDNA Synthese.....</b>	<b>67</b>
<b>4.8 RT-PCR für Integrin <math>\alpha</math>5<math>\beta</math>1 und FN .....</b>	<b>67</b>
<b>4.9 Gelelektrophorese.....</b>	<b>68</b>
<b>4.10 Quantitative mRNA Analyse mittels <i>real-time</i> PCR .....</b>	<b>69</b>
4.10.1 Allgemeines zur Methode .....	69
4.10.2 Beschreibung der Technik .....	69
4.10.3 Datenverarbeitung .....	70
4.10.4 Statistische Analyse.....	71
<b>4.11 Durchflusszytometrie.....</b>	<b>71</b>
4.11.1 Allgemeines zur Methode .....	71
4.11.2 Beschreibung der Technik .....	72
4.11.3 Datenanalyse und Statistik .....	73
<b>4.12 Immunhistochemie.....</b>	<b>73</b>



4.12.1 Allgemeines zur Methode .....	73
4.12.2 Beschreibung der Technik .....	74
<b>4.13 Western Blotting.....</b>	<b>75</b>
4.13.1 Probenvorbereitung .....	75
4.13.2 Proteinbestimmung (BCA-Protein Assay) .....	76
4.13.2.1 Allgemeines zur Methode .....	76
4.13.2.2 Beschreibung der Technik.....	76
4.13.3 SDS-PAGE [modifiziert nach Lämmli <sup>198</sup> ].....	77
4.13.4 Western Blot .....	78
4.13.5 Stripping .....	79
4.13.6 PonceauS Färbung.....	79
<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>81</b>
<b>5.1 FN und Integrin <math>\alpha 5\beta 1</math> bei CED.....</b>	<b>81</b>
5.1.1 Migrationsverhalten der aus Stenosearealen isolierten MC-CLPF .....	81
5.1.2 Expression von FN Spleißformen in der Mukosa von Patienten mit CED..	84
5.1.3 Unveränderte Integrin $\alpha 5\beta 1$ Expression bei Kontroll- und MC-CLPF .....	92
<b>5.2 Stimulation von Kontroll-CLPF mit IFN-<math>\gamma</math>, TNF und TGF-<math>\beta 1</math> .....</b>	<b>96</b>
<b>5.3 Modulation von Kontroll-CLPF mit TGF-<math>\beta 1</math>.....</b>	<b>105</b>
5.3.1 FN und Integrinexpression in mit TGF- $\beta 1$ stimulierten Kontroll-CLPF .....	105
5.3.2 FN und Integrinexpression in mit TGF- $\beta 1$ vorbehandelten Kontroll-CLPF und PDGF-Stimulation im Verwundungsassay .....	113
<b>6. Diskussion.....</b>	<b>122</b>
<b>6.1 FN- und Integrinexpression bei CED.....</b>	<b>122</b>
<b>6.2 IFN-<math>\gamma</math> und TNF reduzieren die FN-Expression .....</b>	<b>128</b>
<b>6.3 TGF-<math>\beta 1</math> stimuliert die FN-Expression bei Kurz- und         Langzeitinkubation .....</b>	<b>131</b>
<b>7. Zusammenfassung .....</b>	<b>139</b>
<b>8. Ausblick.....</b>	<b>141</b>

<b>9. Referenzen .....</b>	<b>142</b>
<b>10. Danksagung .....</b>	<b>160</b>
<b>11. Anhang.....</b>	<b>162</b>
<b>11.1 Originalarbeiten.....</b>	<b>162</b>
<b>11.2 Veröffentlichte Abstracts.....</b>	<b>163</b>
<b>11.3 Weitere Kongressbeiträge.....</b>	<b>165</b>
<b>11.4 Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>166</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Aufbau der Darmwand

Zum besseren Verständnis der folgenden Abschnitte soll zunächst der Aufbau der Darmwand näher beschrieben werden (Abbildung 1-1).

Die Darmwand besteht aus Schleimhaut oder *Mukosa* (Epithel, *Lamina Propria*, *Lamina Muscularis Mucosae*), *Submukosa*, *Muscularis Propria* und *Serosa*. Zum Darmlumen wird die *Mukosa* durch die Epithelzellschicht begrenzt, die auf einer Basalmembran fixiert ist. Den größten Teil der *Mukosa* stellt die *Lamina Propria* dar, welche aus Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Kapillaren und extrazellulärer Matrix besteht. An die *Lamina Propria* schließt sich als letzte Schicht der *Mukosa* die *Lamina Muscularis Mucosae* an, auf die dann die *Submukosa* folgt. Während die *Lamina Muscularis Mucosae* eine etwa 5-Zellen-dicke Schicht von glatten Muskelzellen ist und bei der Darmmotilität eine wesentliche Rolle spielt, besteht die *Submukosa* aus einem losen Maschenwerk von dünnen Kollagenfibrillen, die die *Mukosa* mit der *Muscularis Propria* verbindet und Blutgefäße und Lymphbahnen zur *Muscularis* führt. Die *Muscularis Propria* besteht aus einer dicht gepackten Schicht glatter Muskelzellen, die von dünnen Kollagenfibrillen umgeben sind. Diese Fibrillen verbinden sich zu Kollagenfasern, die die intramuskulären *Septae* bilden. An die Längsmuskelschicht grenzt Bindegewebe (die *Serosa*). Die *Serosa* enthält als Deckschicht ein Epithel, das sie zum *Peritoneum* abgrenzt. Die vorherrschenden Bindegewebsproteine im Darm sind Kollagene. Sie werden von mesenchymalen Zellen wie glatten Muskelzellen und Fibroblasten produziert. Dabei handelt es sich vor allem um Kollagen des Typs I und III <sup>1</sup>.

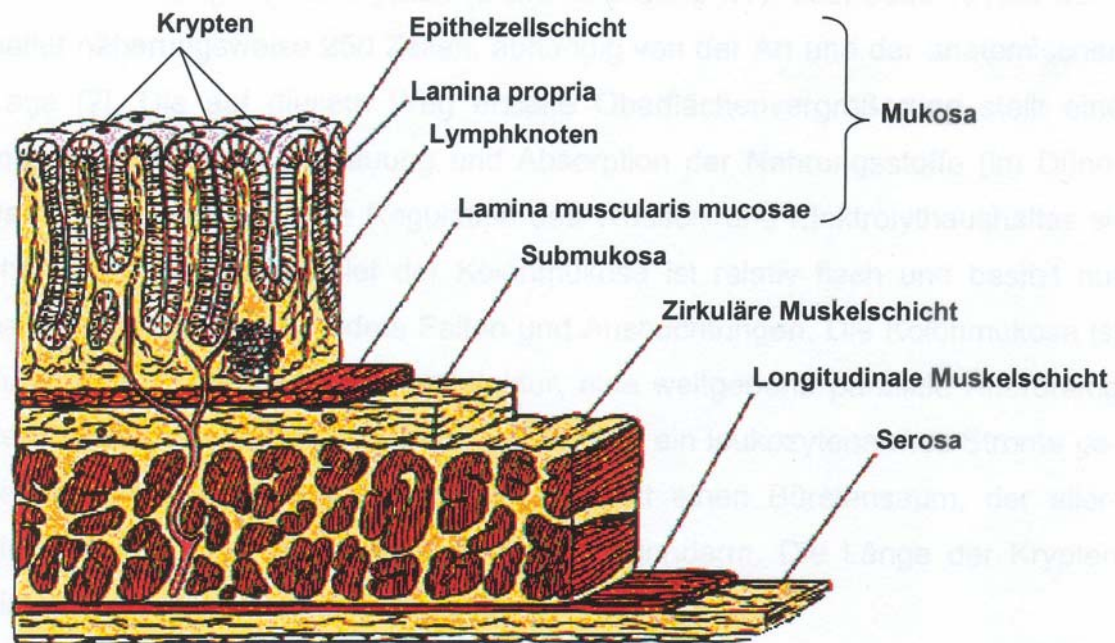


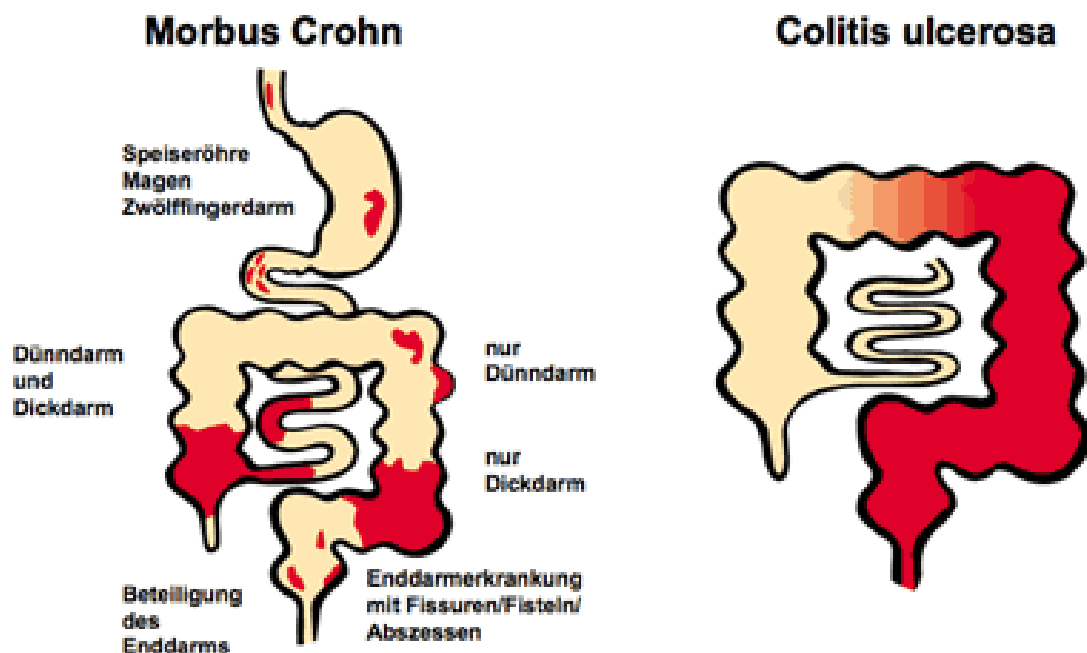
Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der Kolonmukosa<sup>1</sup>. Erklärungen siehe Text.

## 1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Zu den chronisch verlaufenden entzündlichen Darmerkrankungen (CED) zählen der Morbus Crohn (MC) und die Colitis ulcerosa (CU), an denen insbesondere junge Menschen zwischen dem 20. und dem 40. Lebensjahr erkranken. Aber auch Kinder und ältere Menschen können betroffen sein, wobei Männer und Frauen dabei fast gleich häufig erkranken.

Die höchste Inzidenz chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen wird in Nord-Amerika und (Nord-)Europa beobachtet. In Süd-Amerika, Asien und Afrika kommen hingegen wesentlich weniger Fälle vor, jedoch mit steigender Tendenz. Zudem werden neben den geographischen auch ethnische Unterschiede verzeichnet. In den USA sind Kaukasier deutlich häufiger betroffen als Afroamerikaner, letztere wiederum häufiger als Asiaten.

Die Ätiologie der CED ist bisher noch nicht vollständig verstanden. Beide Erkrankungen gehen mit einem Verlust der Mukosa-Integrität, verminderter Resorptionsleistung und verstärkter Sekretion bzw. Exkretion von Flüssigkeit einher. Unterschiede zwischen MC und CU bestehen hinsichtlich makroskopischem und histologischem Erscheinungsbild sowie im Verteilungsmuster. Während eine CU-Erkrankung auf das Kolon beschränkt bleibt, ist beim MC der gesamte Gastrointestinaltrakt vom Mund bis zum Anus betroffen (Abbildung 1-2). Charakteristisch für den MC ist dabei, dass nur einzelne Darmsegmente krankhaft verändert sind und zwischen ihnen gesunde Abschnitte liegen. Besonders häufig sind der letzte Abschnitt des Dünndarms (terminales Ileum), die Übergangsregion vom Dünndarm in den Dickdarm (Ileozökalregion) und das Kolon verändert.



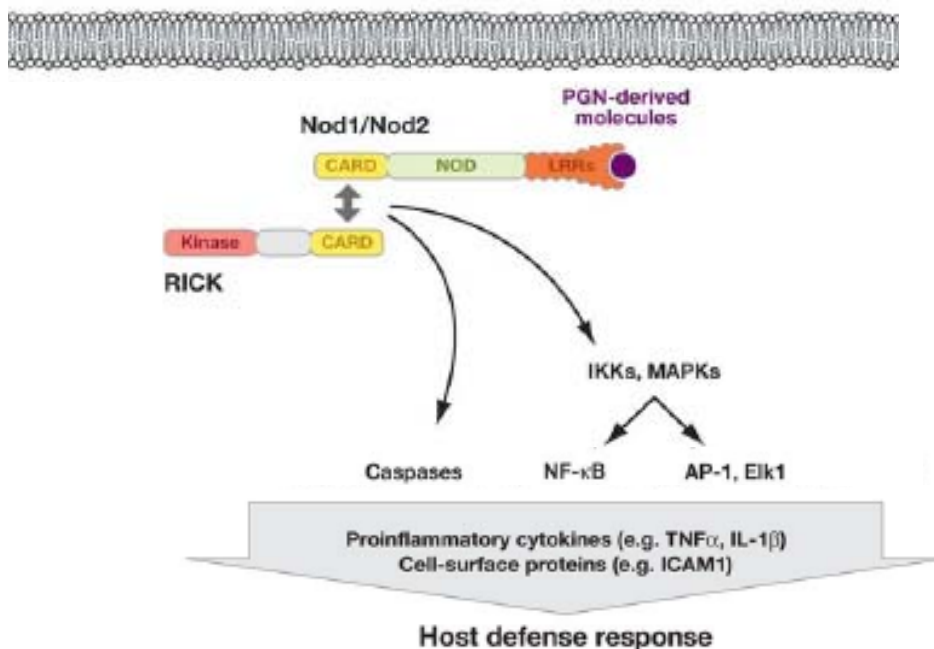
**Abbildung 1-2: Lokalisation der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa.** Quelle: [www.kompetenznetz-ced.de](http://www.kompetenznetz-ced.de)

Das Zusammenspiel von mikrobieller Darmflora und intestinalem Immunsystem sowie Ernährungsgewohnheiten stellt bei der Entstehung von CED einen wichtigen Faktor dar <sup>2-4</sup>. Im Gastrointestinaltrakt finden Immunreaktionen auf pathogene

Substanzen statt, während gleichzeitig Antigene aus der Nahrung sowie physiologische Bakterienflora toleriert werden. Beim gesunden Menschen wird durch ständigen Kontakt der *Lamina propria* mit Antigenen eine milde, genau regulierte chronische Entzündung aufrechterhalten. Kommt es zu einer Permeabilitätsstörung des Darmepithels, gerät die Regulation aus dem Gleichgewicht. Vor dem Hintergrund einer genetischen Disposition und unter Einfluss exogener Faktoren kann dieses Ungleichgewicht in eine CED münden. Rauchen ist ebenfalls ein wichtiger Risikofaktor für einen aggressiven Krankheitsverlauf und das Rezidiv bei MC. Bei einer CU-Erkrankung hat das Rauchen in mehreren Studien hingegen einen protektiven Effekt auf die Krankheitsmanifestation gezeigt <sup>3</sup>.

Andere Befunde deuten auf eine besondere Rolle von genetischen und auch immunologischen Faktoren bei beiden Erkrankungen. So gilt eine positive Familienanamnese als Risikofaktor bei MC. Aus familiären Untersuchungen und Konkordanzstudien an Zwillingen kann auf eine genetische Prädisposition für MC geschlossen werden. Monozygote Geschwister haben bei Erkrankung ihres Zwillings ein 15-35-fach erhöhtes Risiko an MC zu erkranken als die Durchschnittsbevölkerung <sup>3, 5</sup>. Durch Kopplungsanalysen konnten unter anderem Risikoregionen auf den Chromosomen 12 und 16, sowie weitere potentielle Regionen auf den Chromosomen 3, 7 und 11 im Zusammenhang mit einer MC-Erkrankung identifiziert werden <sup>6</sup>. So treten bei MC-Patienten gehäuft Varianten (*single nucleotide polymorphisms* (SNP)) von Nod2/CARD15 auf dem Chromosom 16 auf <sup>7, 8</sup>. Das Nod2/CARD15 Protein erkennt zytoplasmatisch Bestandteile der Bakterienwand (Muramyl-dipeptide (MDP)) und interagiert mit der Kinase RICK/RIP2 (*RIP-like interacting caspase-like apoptosis-regulatory protein kinase/receptor interacting protein2*) <sup>9</sup> (Abbildung 1-3). Diese bindet den IKK-Komplex <sup>10</sup>, der für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B über die Phosphorylierung und

Degradierung des endogenen NF- $\kappa$ B-Inhibitors I $\kappa$ B- $\alpha$  verantwortlich ist <sup>11</sup>. Die beobachteten SNP8, 12 und 13 im Nod2/CARD15 Gen zeigen eine verminderte, von der Mutation individuell abhängige Induzierbarkeit von NF- $\kappa$ B nach Stimulation mit Bakterienwandbestandteilen bzw. MDP <sup>12-14</sup>, die mit dem Risiko an MC zu erkranken korreliert <sup>12</sup>. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine heterozygote Mutation zu einem doppelten bis vierfachen Risiko führt, einen MC zu entwickeln. Homozygote bzw. mehrere *compound* heterozygote NOD2-Mutationen steigern das Risiko um das 20 – 40-fache <sup>8, 15</sup>.



**Abbildung 1-3: Vereinfachte schematische Darstellung des Nod2 Signalwegs.** Die Erkennung von bakteriellem MDP durch die Leucin-reiche Domäne (*leucine rich repeats*, LRR) des Nod2-Proteins führt zu einer Oligomerisation und Rekrutierung der Kinase RICK durch eine CARD-CARD-Interaktion. Verschiedene Kinasekomplexe werden gebildet sowie aktiviert, das in einer Phosphorylierung von IKKs, MAPKs und IRF-3 resultiert und zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, AP-1 und Elk-1 und Caspasen (wichtigste Enzyme der Apoptose) führt. Im Zellkern stimulieren die Faktoren die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen und Zelloberflächenmolekülen. Caspasen wie Caspase-1 induzieren die Aktivierung von pro-IL-1 und pro-IL-18 durch proteolytische Spaltung. Modifiziert nach Inohara <sup>16</sup>.

Die Annahme einer Barriestörung im Intestinum konnte bei Patienten mit MC durch das vermehrte Finden von intrazellulären Bakterien in intestinalen Epithelzellen und in tieferen Schichten der Mukosa bestätigt werden <sup>17</sup>. Bei Patienten kann diese erhöhte Permeabilität schon lange vor dem Auftreten der ersten Krankheitssymptome nachgewiesen werden <sup>18-20</sup>. Interessanterweise lassen sich diese Beobachtungen nicht nur auf mukosale Entzündungsaktivität zurückführen, sondern sind auch mit einer genetischen Prädisposition verbunden, da Verwandte von CED-Patienten eine höhere intestinale Permeabilität im Vergleich zur Normalbevölkerung aufweisen <sup>19</sup>.

### **1.3 Mögliche Komplikationen und extraintestinale Manifestationen bei MC und CU**

Bedingt durch die entzündlichen Veränderungen und deren Folgen an der Darmwand kommt es beim MC zu verschiedenen Symptomen wie Malabsorption, krampfartigen Schmerzen, Diarrhöen und Gewichtsverlust. Abszesse, Fisteln (siehe 1.3.1) und Fissuren können als perianale Veränderungen erscheinen. Des Weiteren können Stenosen (siehe 1.3.2), Strikturen sowie Perforationen mit folgender Peritonitis auftreten. Bei einer CU-Erkrankung sind die Hauptsymptome blutig-schleimige Diarrhöen, rektale Blutungen und Tenesmen. Es können ebenfalls Perforationen mit folgender Peritonitis aber auch toxisches Megakolon bis hin zum häufig multifokalen, spät diagnostizierbaren Colonkarzinom entstehen.

Bei beiden Erkrankungen sind jedoch auch Manifestationen außerhalb des Darmes, so genannte extraintestinale Veränderungen, möglich. Diese können sich z.B. in Form von Gelenkschmerzen (Arthritis), Anämie sowie in Entzündungen der Augen,



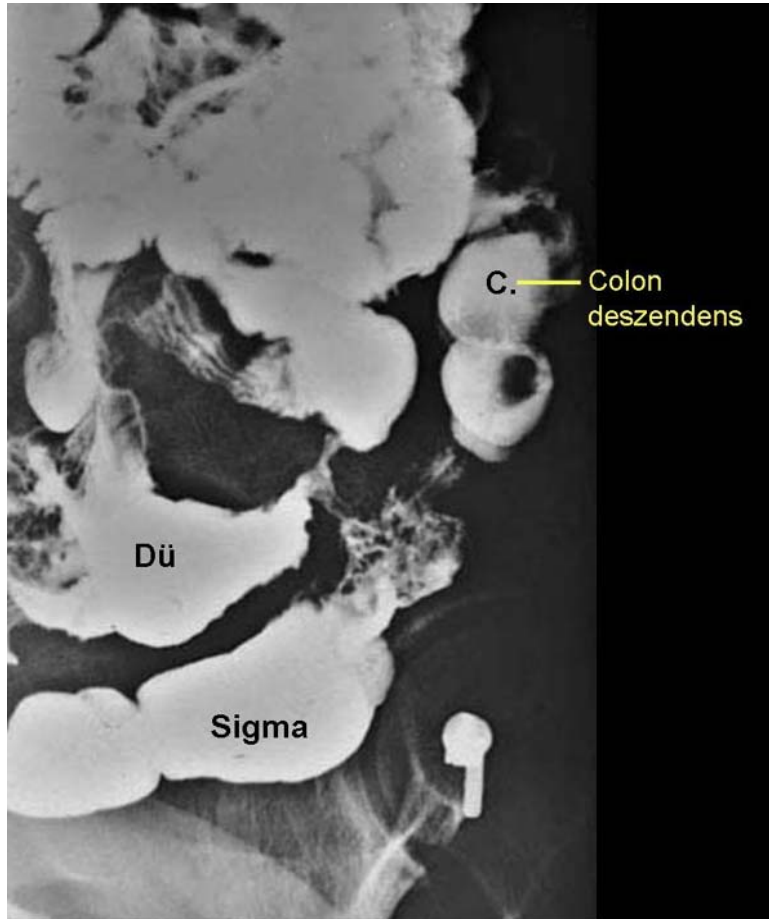
der Haut, der Gallenwege (Gallensteine) und der Leber (primär sklerosierende Cholangitis) äußern.

### **1.3.1 Gestörte Wundheilung und Bildung von Fisteln**

MC und CU gehen mit Ulzerationen und großen Wundarealen einher <sup>21</sup>. Die Wundheilung ist bei diesen Erkrankungen jedoch häufig gestört. Gerade nach einer Proktektomie <sup>22-27</sup> oder Proktokolektomie <sup>22</sup> ist eine langsame Heilung der Operationswunden nicht selten. Eine weitere Komplikation stellen Fisteln dar (Abbildung 1-4). Fisteln sind abnorme röhrenförmige Gänge, welche von einem Hohlorgan ausgehen und an der Körperoberfläche (äußere Fisteln) münden oder nur im Körperinneren verlaufen (innere Fisteln). Im Verlauf ihrer Erkrankung entwickeln mehr als ein Drittel aller Patienten mit MC eine oder mehrere Darmfisteln. Sie heilen sehr schlecht ab, da eine Wundheilung in diesem Bereich gestört ist. Zur Klärung der Entstehung von perianalen Fisteln gibt es verschiedene Hypothesen. Eine besagt, dass Fisteln als tiefe penetrierende Ulzeration im Anus oder Rektum beginnen. Dort lagert sich über die Zeit der Kot in die Ulzeration ein. Während der Darmentleerung wird durch den intraluminalen Druck der Kot in das subkutane Gewebe gedrückt, so dass die Ulzeration zunimmt und Fisteln entstehen. Die zweite Hypothese vermutet, dass sich perianale Fisteln aus einem Analdrüsenabszess entwickeln <sup>28</sup>. Eine häufig angewendete anti-TNF-Therapie zur Behandlung der Fisteln zeigt bei über 50% der Patienten keine Verbesserung <sup>29</sup>.

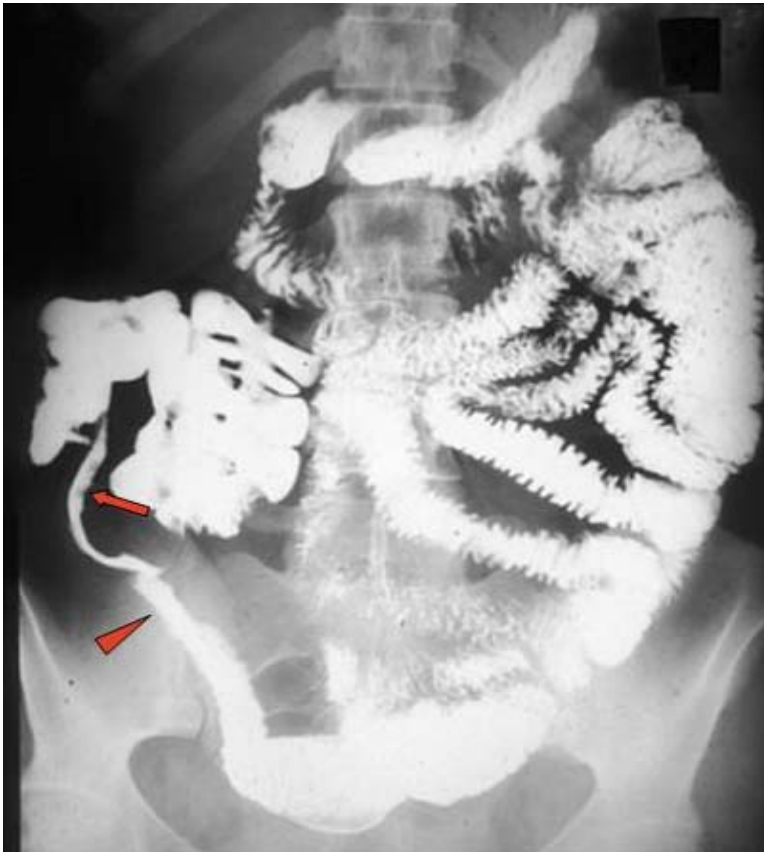
Die Heilungsprozesse sind meist langwierig und stellen für die behandelten Patienten eine hohe physische und psychologische Belastung dar. Neue Therapieansätze zur medikamentösen Behandlung von Fisteln und zur Verbesserung der postoperativen Wundheilung bei MC und CU sind deshalb zwingend notwendig. Dafür müssen

allerdings erst die Mechanismen, die bei der Wundheilung eine Rolle spielen, verstanden werden.



**Abbildung 1-4: Entero-**  
**kolische Fistel:** Magen-  
Darm-Passage im Mono-  
kontrast.

Quelle: Prof. Dr. K. J. Klose:  
Medizinisches Zentrum für  
Radiologie, Klinik für  
Strahlendiagnostik, Klinikum  
der Philipps-Universität  
Marburg



**Abbildung 1-5: Mono-**  
**kontrastdarstellung des**  
**MC-Dünndarms mit lang-**  
**streckiger Stenose** des  
präterminalen Ileums  
(Pfeilspitze) und terminalen  
Ileums (Pfeil) = klassische  
Ileitis terminalis (string sign)  
(Akutstadium)

Quelle: Prof. Dr. K. J. Klose:  
Medizinisches Zentrum für  
Radiologie, Klinik für  
Strahlendiagnostik, Klinikum  
der Philipps-Universität  
Marburg

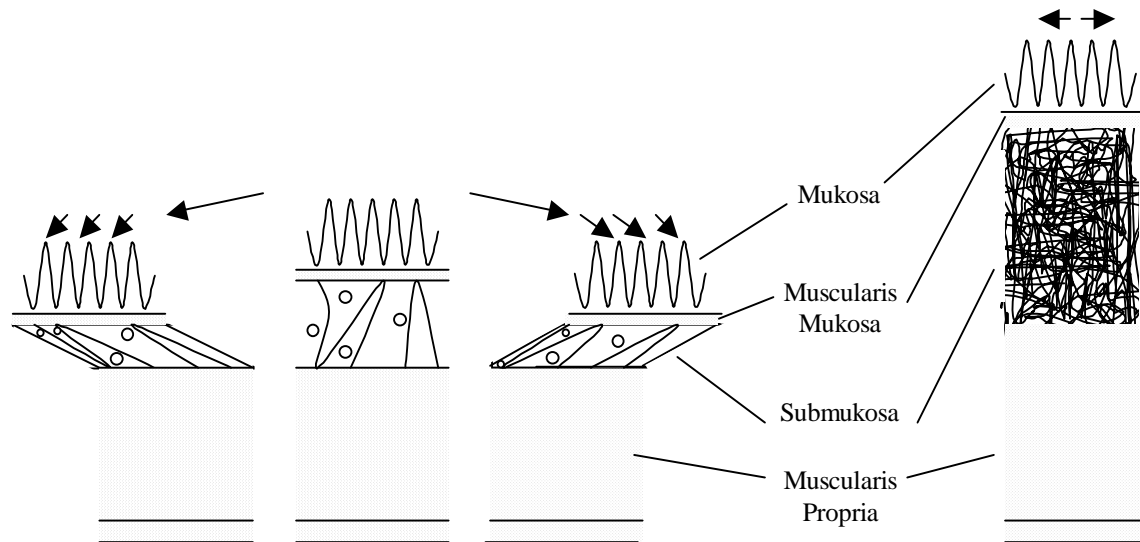
### 1.3.2 Überschießende Wundheilung und Entstehung von Stenosen

Etwa 40-50% der MC-Patienten (jedoch weniger CU-Patienten) leiden unter Stenosen (Darmverengungen) (Abbildung 1-5). Ein operativer Eingriff ist trotz ärztlicher Betreuung und richtiger medikamentöser Behandlung meist unumgänglich. Die Ursache der Entstehung von Stenosen ist noch nicht endgültig geklärt. Bekannt ist jedoch, dass Patienten mit einer Mutation im Nod2-Gen (siehe oben) ein erhöhtes Stenoserisiko aufweisen. Auch neigen diese Patienten eher zu rezidivierenden Stenosen als Patienten, die das Wildtyp-Nod2-Gen tragen<sup>30, 31</sup>.

Als Ursache für die Stenoseentstehung wird eine überschießende Wundheilung nach Gewebeerstörung in der Mukosa, Submukosa und *Muscularis Propria* vermutet<sup>1</sup>. Im gesunden Darm ermöglichen die dünnen Kollagenfibrillen der Submukosa die Bewegung der Mukosa über die *Muscularis*. Diese Beweglichkeit geht im

entzündeten Darm verloren und führt zur Haftung der Mukosa an der *Muscularis Propria* (Abbildung 1-6).

Weitere wichtige Faktoren für die Stenosebildung sind die Stärke der Entzündung und deren Chronizität. So scheint eine Verletzung der Submukosa für eine mesenchymale Zellantwort nötig zu sein. Mesenchymale Zellen migrieren in die beim MC typischerweise involvierte Submukosa ein, um dort zu proliferieren und durch Bildung von Kollagen den Gewebedefekt zu verschließen. Dies kann zu einer verstärkten Kollagenanhäufung und somit zu einer Stenose führen <sup>1</sup>. Die Migration von Fibroblasten, Myofibroblasten (durch PDGF differenzierte und aktivierte Fibroblasten) und glatten Muskelzellen aus der *Muscularis Mucosae* in die Submukosa und auch Mukosa ist bisher unzureichend verstanden, ebenso wie die Faktoren, die zur Induktion der Migration führen. Sicher ist, dass es bei einer CED zu einer überschießenden Wundheilungsreaktion durch vermehrte Kollagen- und mesenchymaler Zellanhäufung kommen kann. Dieser Prozess führt zu einer veränderten Architektur des Darms und somit zu einer Beeinträchtigung der Darmfunktion. Das eigentliche Hohlorgan wird durch die überschießende Wundheilung, die Unbeweglichkeit der Mukosa sowie die Verdickung aller Schichten undurchgängig. Die entstandenen Stenosen weisen neben der verstärkten Kollageneinlagerung in der Submukosa verdickte Muskelschichten auf, die wahrscheinlich auf Zellproliferation und Hypertrophie zurückzuführen sind <sup>1</sup>.



**Abbildung 1-6: Die Rolle des submukosalen Kollagens in Bezug auf die Beweglichkeit der Mukosa über die *Muscularis*.** Modifiziert nach Graham, S. 221 <sup>1</sup>

Wenn mesenchymale Zellen wie Fibroblasten, Myofibroblasten und Muskelzellen in den Wundheilungsprozess involviert sind, erfährt repariertes Gewebe eine Kontraktion, welches auch bei Hautverbrennungen beobachtet wird. Dies lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass sowohl glatte Muskelzellen als auch Fibroblasten fremde Matrix, auf der sie wachsen, kontrahieren können. Im vernarbten Darm führt diese Kontraktion von Matrix und mesenchymalen Zellen zur Bildung einer Stenose <sup>1</sup>.

## 1.4 Migration von Fibroblasten und Myofibroblasten

Myofibroblasten und Fibroblasten sind in allen humanen Organen und Geweben zu finden. Sie gehören zur Familie der Bindegewebszellen und sind für das architektonische Gerüst des Körpers von großer Bedeutung. Sie üben eine wichtige Stützfunktion aus und sind wichtige Strukturgeber.

Bei der Wundheilung spielen die Migration, Proliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten aber auch deren Produktion von extrazellulärer Matrix eine wesentliche Rolle <sup>32</sup>. So ist das Einwandern von mesenchymalen Zellen aus dem umliegenden unverletzten Gewebe in die Wunde ein essentieller Schritt zur Heilung. In der frühen Phase der Wundheilung wird geschädigtes Bindegewebe durch intensive Abbauprodukte entfernt. Eine Induktion dieser Abbauprodukte bewirkt eine Modulation von Fibroblasten und somit deren Einwanderung in das Wundareal. Fibroblasten, die in das Granulationsgewebe migrieren, stammen von ruhenden und möglicherweise undifferenzierten Fibroblasten aus dem umliegenden Gewebe. Nach ihrer Aktivierung verändern sich die Fibroblasten phänotypisch und wandern durch zyklische Anheftung und Ablösung der Adhäsionsmoleküle von den Proteinen der Extrazellulärmatrix gerichtet entlang eines chemotaktischen Gradienten zur Wunde <sup>33</sup>.

Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte sind essentiell für die Wundheilung. Die nötigen Kommunikationsprozesse werden über Adhäsionsmoleküle vermittelt, deren Expression zu einem durch ihre Liganden oder zum anderen durch ein suppressiv oder stimulierend wirkendes Zytokinmilieu reguliert wird. Die Adhäsionsmoleküle übertragen anschließend Signale in das Zellinnere. Dadurch wird eine Kommunikation mit dem Zellkern ermöglicht, die häufig mit einer Aktivierung oder Deaktivierung der entsprechenden Zelle einher geht <sup>33</sup>.

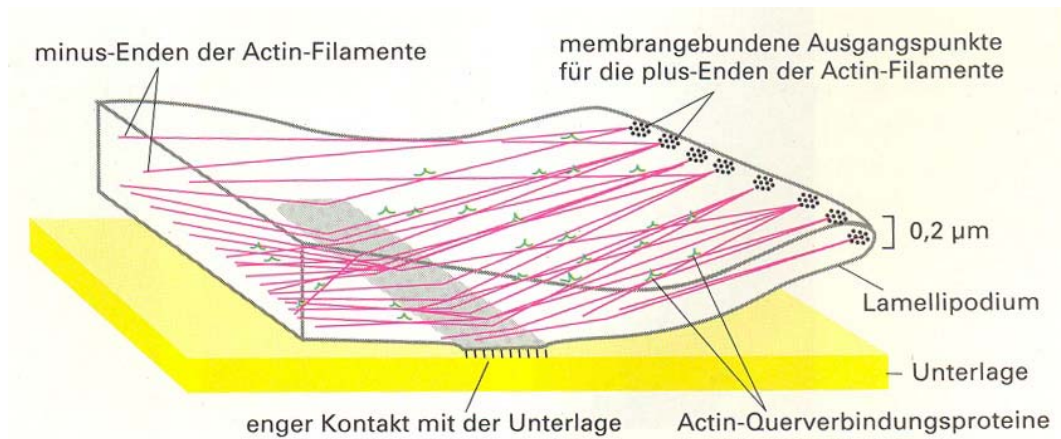
Adhäsionsmoleküle werden in charakteristischen Mustern von allen an der Wundheilung beteiligten Zelltypen exprimiert. In der Frühphase der Wundheilung kommt es wahrscheinlich durch Hochregulation bestimmter Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche zu einer Induktion von Wanderungsprozessen. Fibroblasten scheinen gerade in diesen frühen Phasen ihre maximale Aktivität zu entfalten. Das Eindringen in das Granulationsgewebe erfolgt somit sehr schnell.

## **1.5 Morphologie sich bewegender Fibroblasten: Mikrospikes und Lamellipodien**

Fibroblasten gehören zu den humanen Zellen, die selbständig über Oberflächen wandern können. Dabei strecken sie in regelmäßigen Abständen Lamellipodien und Mikrospikes aus. Während Lamellipodien dünne, flächige Fortsätze sind, die aus einem dichten Geflecht von Aktinfilamenten bestehen, enthalten die dünnen, steifen Mikrospikes mit einem Durchmesser von ca. 0,1  $\mu\text{m}$  und einer Länge von 5-10  $\mu\text{m}$  im Inneren lockere Bündel aus etwa 20 Aktinfilamenten <sup>34</sup>.

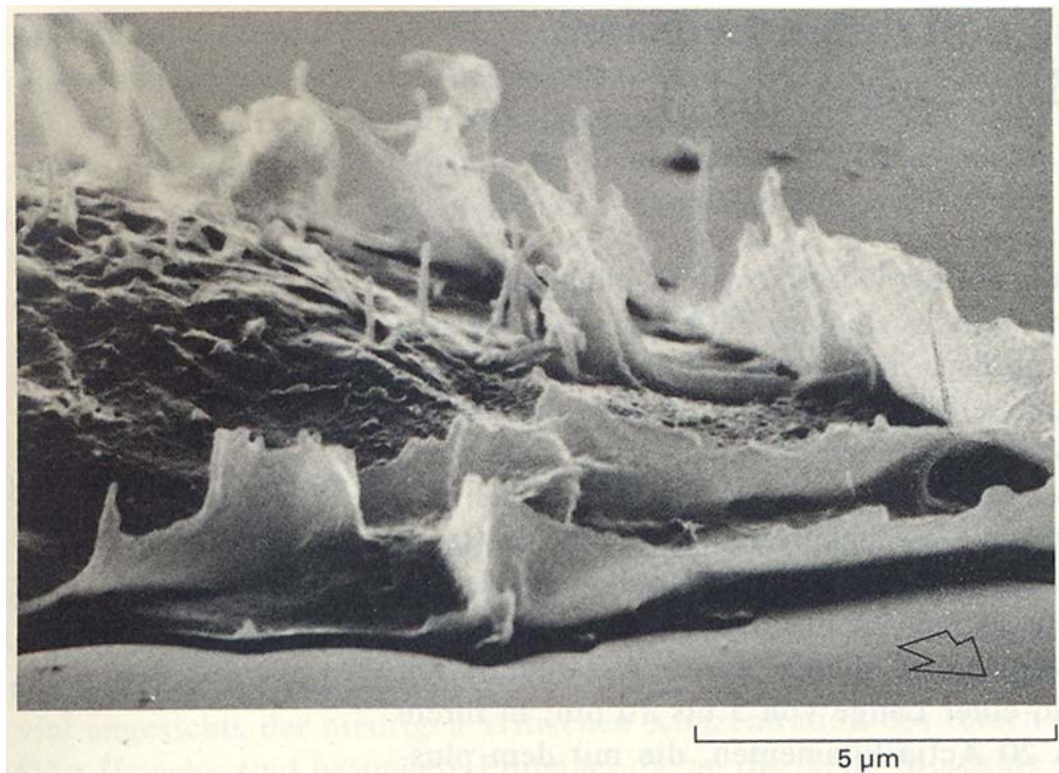
Die Aktinfilamente im Lamellipodium erscheinen stärker geordnet als in anderen Bereichen der Zellrinde. Ein großer Teil dieser Filamente ragt nach außen, während das Plus-Ende im Leitsaum plasmamembranständig ist (Abbildung 1-7). Das Lamellipodium verhält sich als Struktureinheit. Bei einer Nicht-Anheftung an der Unterlage, klappt es meistens schnell als „Kräuslung“ über die Zelle nach hinten (Abbildung 1-8).

Lamellipodien und Mikrospikes können sich sehr schnell bilden und wieder verschwinden. Wahrscheinlich entstehen sie durch örtlich begrenzte Polymerisation von Aktin an der Plasmamembran. Dabei kann sich die Plasmamembran schnell - ohne zu zerreißen - nach außen wölben <sup>34</sup>.



**Abbildung 1-7: Schematische Darstellung des Lamellipodiums mit seinen Aktinfilamenten (rot).**

Quelle: Alberts *et al.* <sup>34</sup>



**Abbildung 1-8: Wandernder humaner Fibroblast mit Lamellipodien und Mikrospikes am Leitsaum (Rasterelektronenmikroskopie).** Während sich der Fibroblast bewegt, Wanderungsrichtung ist mit dem Pfeil angedeutet, gleiten Lamellipodien und Mikrospikes nicht an der Kulturschale haftend über die Oberseite zum hinteren Ende der Zelle. Diese Bewegung wird „Kräuslung“ genannt. Quelle: Alberts *et al.* <sup>35</sup>

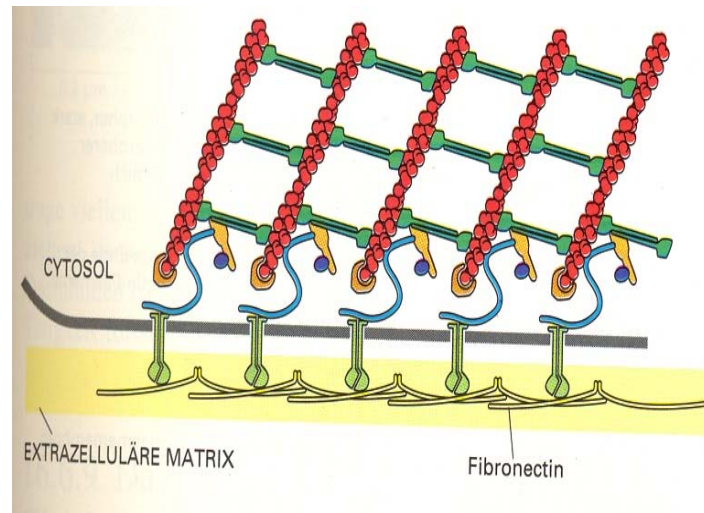


## 1.6 Die Migration von humanen Zellen ist Aktin-abhängig

Die Bewegung von humanen Zellen ist ein auf molekularer Ebene schwer zu erklärendes Phänomen. Es verändern sich verschiedene Teile der Zelle gleichzeitig und es gibt kein erkennbares Bewegungsorganell wie beispielsweise eine Flagelle bei Einzellern.

Die Wanderung der Tierzelle beruht auf viele Aktinumdrehungen. Bei genauer Betrachtung der Aktinfilamente im Leitsaum kann eine ununterbrochene Wanderung des Aktins durch die Zelle nach hinten von 1  $\mu\text{m}$  je Minute beobachtet werden. Im Zellinneren hingegen wird das Aktin fortlaufend depolymerisiert. Anscheinend bilden sich im Leitsaum nicht nur neue Filamente, sondern werden auch Monomere angefügt, so dass sich die Filamente verlängern<sup>35</sup>. Das Aktin lagert sich dabei unter anderem zu Lamellipodien und Mikrospeikes zusammen, es verbindet sich mit Fokalkontakten oder bildet Stressfasern.

Damit sich ein Fibroblast über eine Oberfläche bewegen kann, ziehen Stressfasern an der extrazellulären Matrix oder einer anderen Zelle. Die Stressfaser muss dabei an der richtigen Stelle fest in der Plasmamembran über Transmembranverbindungsproteine zwischen zellinneren Aktinfilamenten und extrazellulärer Matrix verankert sein. Der größte Teil der Fibroblastenzelloberfläche ist durch einen über 50 nm breiten Spalt von der Unterlage getrennt. Die Fokalkontakte dagegen verringern diesen Abstand auf 10-15 nm. Dort besteht eine Anheftung der Plasmamembran an Bestandteile der extrazellulären Matrix über die extrazelluläre Domäne der Integrine. Der zytoplasmatische Integrinteil ist über das Protein Talin und das wiederum über Vinculin an die Aktinfilamente in den Stressfasern gekoppelt (Abbildung 1-9)<sup>36</sup>.

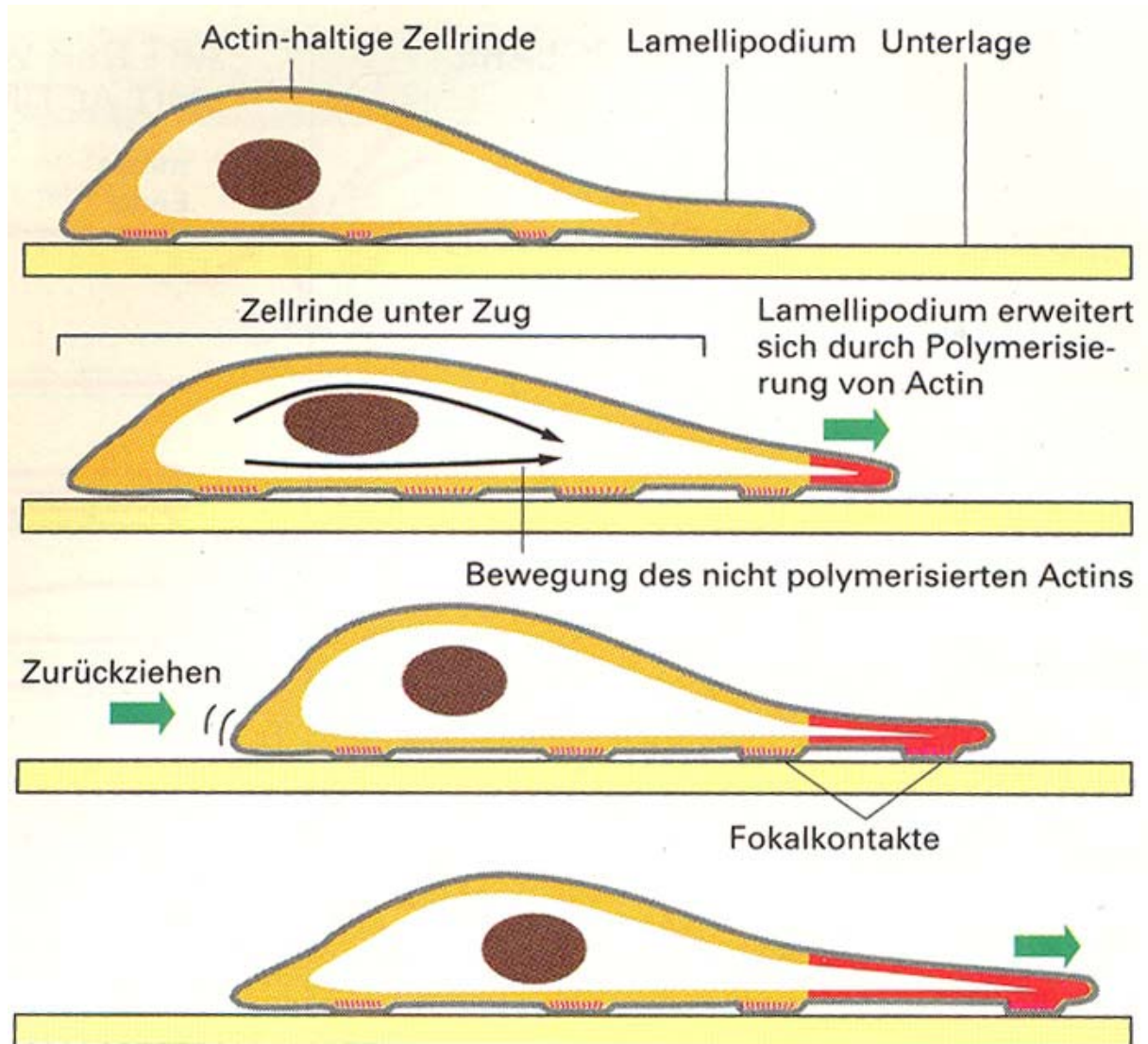


**Abbildung 1-9: Modell des Mechanismus, mit dem Integrine in der Plasmamembran die intrazellulären Aktinfilamente an einem Fokalkontakt mit der extrazellulären Matrix koppeln.** Es bildet sich ein Fokalkontakt, wenn sich Integrine an der Kontaktstelle ansammeln und an der Zellaußenseite an Matrixglykoproteinen wie Fibronektin binden. Quelle: Alberts *et al.* <sup>36</sup>.

Stark vereinfacht kann man die Bewegung von Zellen in drei Einzelvorgänge unterteilen (Abbildung 1-10):

- *Die Ausstülpung:* Durch die Polymerisation von Aktin am Leitsaum strecken sich Lamellipodien und Mikrospeikes aus der Vorderseite der Zelle nach vorne über das Substrat.
- *Die Anheftung:* Transmembranrezeptoren für Proteine der extrazellulären Matrix verbinden die Plasmamembran mit der Unterlage. Aktinfilamente im Zytoplasma der Stressfasern treten über Aktin-bindende Proteine mit den zytoplasmatischen Domänen dieser Rezeptoren in Wechselwirkung. Die Kontakte zwischen Zelle und Unterlage müssen ständig neu hergestellt und wieder gelöst werden, damit sich die Zelle vorwärts bewegen kann.
- *Der Zug:* Der Zellkörper bewegt sich vorwärts, indem sich wahrscheinlich der vordere Teil der Zelle aktiv wie eine Muskelfaser zusammen zieht und der Zellkern, sowie die Hauptmenge des Zytoplasmas passiv hinterher gezogen werden. Nach einer anderen Theorie schiebt sich die Aktin-haltige Zellrinde

durch die Polymerisation der Aktinfilamente vorwärts, so dass in der Zellrinde eine Spannung entsteht. Die dadurch entstehende Kontraktionskraft zieht die hinteren Teile der Zelle nach <sup>36</sup>.

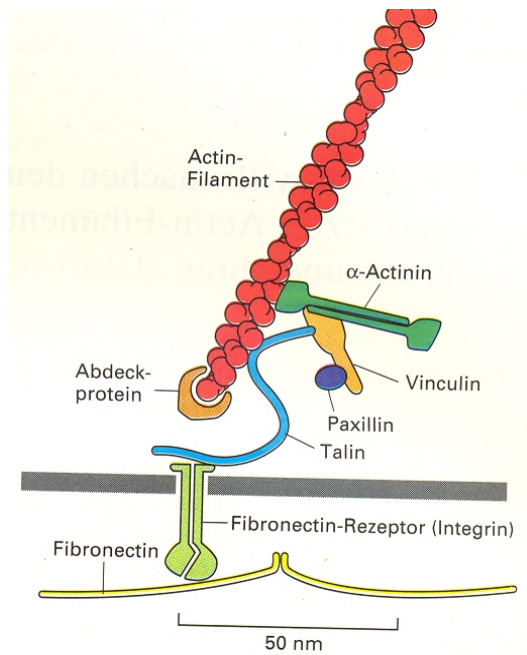


**Abbildung 1-10: Modell für die Fortbewegung der Zelle.** Die Aktin-haltige Zellrinde dehnt sich durch Aktin-abhängige Ausstülpung und feste Anheftung eines Lamellipodiums am Leitsaum. Die Zelle wird durch die entstehende Zugkraft nach vorne gezogen. Es entstehen neue Fokalkontakte, während sich alte auflösen. Die Zelle kann sich vorwärts bewegen, indem sich dieser Kreislauf ständig wiederholt. Das neu polymerisierte Aktin in der Zellrinde ist rot hervorgehoben. (Modifiziert nach Alberts *et al.* <sup>36</sup>)

## 1.7 Die Rolle der *Focal Adhesion Kinase* (FAK) bei der Zellmigration

Die Fokalkontakte haben neben der Verankerungsfunktion die Aufgabe, Signale von der Extrazellulärmatrix an das Zytoskelett weiterzuleiten. Es sind mehrere Proteinkinasen in den Fokalkontakten lokalisiert<sup>36</sup>. In den fokalen Adhäsionen findet man unter anderem eine Phosphorylierung der zytoplasmatischen, rezeptorfreien Protein-Tyrosin-Kinase FAK (p125 *focal adhesion kinase*). Da FAK-defiziente Zellen ein stark vermindertes Migrationspotential aufweisen, geht man davon aus, dass die Phosphorylierung von FAK eine wichtige Rolle bei der Zellmigration spielt<sup>37</sup>. Die FAK-Phosphorylierung ist von einer Vielzahl an Stimuli abhängig, die an der Regulierung von Zellmorphologie, -adhäsion und -bewegung beteiligt sind. Bei der Bindung von Integrinen an Proteinen der EZM wird FAK an Tyrosinresten phosphoryliert<sup>37</sup>.

FAK ist ein Teil eines Zytoskelett-assoziierten Netzwerks von Signalproteinen, zu dem die Protein-Tyrosin-Kinasen der Src-Familie, p130<sup>Cas</sup>, Shc und Grb2 gehören. Sie wirken gemeinsam bei der Übermittlung der Integrinsignale in die ERK/JNK MAP (*mitogen-activated protein*) Kinase-Kaskade<sup>37</sup>. FAK bindet an Proteine, die eine Src Homologe 2 (SH2)-Domäne enthalten<sup>38-40</sup>. SH2-Domänen, die mit FAK assoziieren, sind pp60<sup>src</sup>, GRB-2, p85 $\alpha$ , PLC- $\gamma$ , Nck, Crk und Csk<sup>38</sup>. Die FAK-Phosphorylierung wird unter anderem von der zytoplasmatischen Domäne des Integrins induziert<sup>41</sup>. FAK ist indirekt zur Seite der Integrin-Rezeptor-Kluster lokalisiert und interagiert - vermittelt durch die C-terminale Domäne<sup>42</sup> – über die Integrin-assoziierten Proteine Talin<sup>40</sup> und Paxillin<sup>43, 44</sup> mit den Rezeptoren. Talin wiederum bindet an Vinculin, das sich mit  $\alpha$ -Aktinin zusammenlagert und an ein Aktinfilament koppelt (Abbildung 1-11).

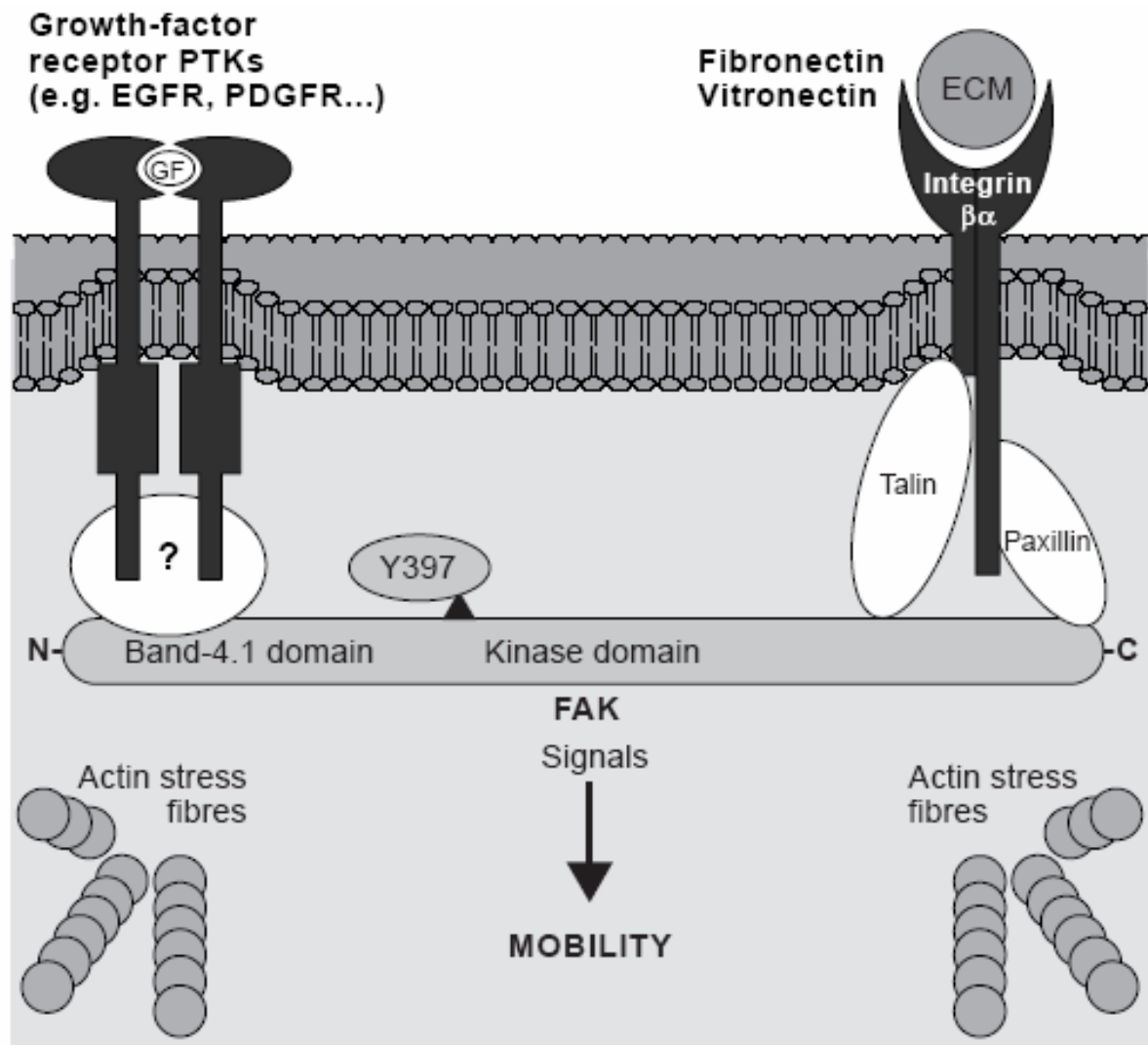


**Abbildung 1-11: Integrin-assoziierte Proteine**

**Talin und Paxillin** lagern sich mit Vinculin und  $\alpha$ -Aktinin mit Integrinen zu einem Komplex zusammen, der an ein Aktinfilament gekoppelt ist <sup>36</sup>.

Durch die Bindung eines Liganden wie Fibronectin an Integrine erfolgt eine Phosphorylierung von FAK an 7 – 8 verschiedenen Tyrosinresten u. a. an der Autophosphorylierungsstelle Tyr 397 und damit eine Integrin-vermittelte Migration über  $\alpha$ -Aktinfilamente. Über seine N-terminale Domäne bindet FAK an die Rezeptoren von Wachstumsfaktoren und fördert so die PDGF- und EGF-stimulierte Zellmigration <sup>37</sup>. Durch die Bindung des jeweiligen Wachstumsfaktors an den Rezeptor wird diese Protein-Tyrosin-Kinase schließlich phosphoryliert <sup>45</sup>. Diese Phosphorylierung wird durch das Klustern von Ligand-besetzten Integrinen synergistisch erhöht.

FAK fungiert somit als Rezeptor-proximales Brückenprotein, da es die Signaltransduktionswege von Wachstumsfaktoren und Integrinen verbindet <sup>37</sup> (Abbildung 1-12).



**Abbildung 1-12: Model der Funktionsweise von FAK:** Die indirekte Co-Lokalisation von FAK mit Integrin- und Wachstumsfaktor-Rezeptor-Klustern führt zur Wirkung von FAK als Rezeptor-proximales regulatorisches Protein. Es sind sowohl die Phosphorylierung von FAK an der Autophosphorylierungsstelle Tyrosin 397 als auch die Integrität des Zytoskeletts nötig, damit FAK die Wachstumsfaktoren- und Integrin-vermittelte Migration fördern kann. In Anlehnung an Sieg *et al.*<sup>37</sup>

Die Wachstumsfaktoren führen wahrscheinlich zu einer erhöhten Expression von Oberflächenintegrinen und zu einer Expressionsverstärkung von bestimmten Extrazellulärmatrixproteinen<sup>46, 47</sup>. Dies trägt zum Synergismus zwischen Wachstumsfaktor- und Integrin-vermittelter Migration bei. Die Fibroblastenmigration wird also durch ein komplexes Zusammenspiel von EZM-Proteinen - Fibronectin<sup>48</sup>, Vitronectin<sup>49</sup>, Kollagen I, Kollagen IV und Laminin<sup>50</sup> sind Extrazellulärmatrix-

Komponenten, die für die Zellmigration eine agonistische Funktion ausüben -, FAK-Phosphorylierung, Wachstumsfaktoren und Integrinexpression bewirkt. Beeinflusst wird die Migration somit unter anderem durch die Regulierung von Integrinexpression und die Aktivierung von FAK und MAP-Kinasen.

## **1.8 Fibronektin, Wachstumsfaktoren und Zytokine und deren Bedeutung für die Zellmigration**

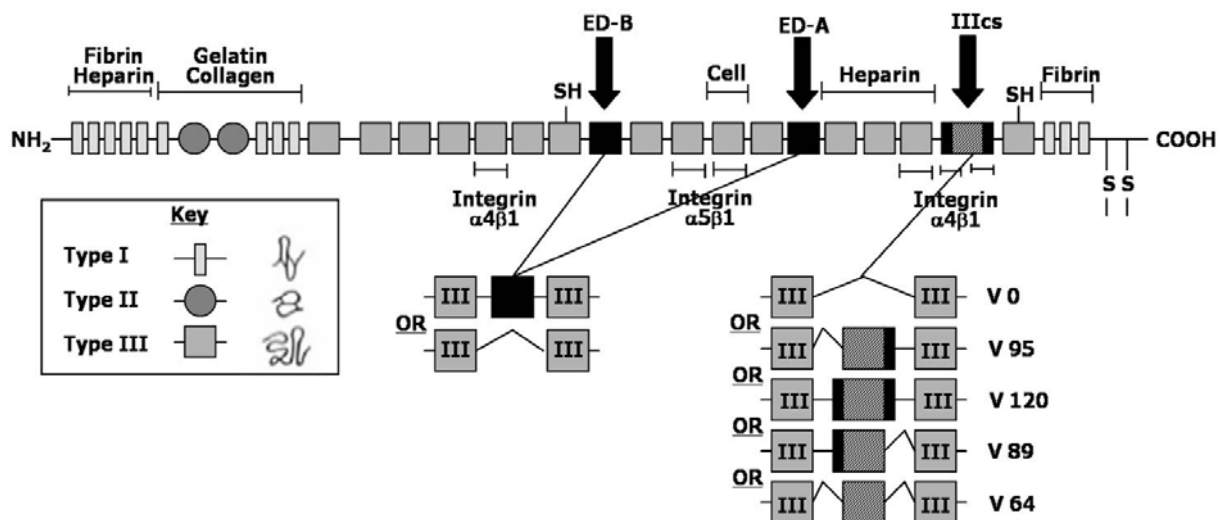
Die Migration intestinaler Myofibroblasten wird wahrscheinlich durch eine Vielzahl löslicher Faktoren moduliert, die während der Wundheilung und der Entzündung von intestinalen Fibroblasten, Myofibroblasten und anderen Zellen verstärkt sezerniert werden können. Im folgenden Abschnitt soll auf migrationsbeeinflussende Faktoren wie Fibronektin, Wachstumsfaktoren und Zytokine eingegangen werden, mit denen die Experimente dieser Arbeit durchgeführt wurden.

### **1.8.1 Fibronektin**

Fibronektin (FN) ist ein extrazelluläres Glykoprotein, das Migration, Zelladhäsion, Proliferation und Differenzierung vermittelt. Außerdem spielt es wichtige physiologische Rollen während der embryonalen Entwicklung und Gewebsverwundung <sup>51</sup>.

Fibronektine (FNe) sind über Disulfidbrückenbindungen verbundene, dimere Matrixproteine mit strukturellen Typ I, II und III Domänen, welche an Zellen, Kollagen, Proteoglykane, Oberflächenrezeptoren und Fibrin binden können <sup>51, 52</sup>. Aufgrund alternativen Spleißens des RNA-Primärtranskripts können bis zu 20 verschiedene Isoformen exprimiert werden. Hauptsächlich tritt das alternative Spleißen in den 2

homologen Typ III Domänen ED-A und ED-B sowie in der nicht homologen Domäne namens *type III connecting segment* (IIIcS) auf <sup>53-57</sup>. Die ED-A und ED-B Segmente sind entweder komplett enthalten oder entfernt (Abbildung 1-13). Alternatives Spleißen der IIIcS-Region ist komplexer. IIIcS kann komplett integriert, teilweise oder völlig entfernt sein <sup>58</sup>. Über eine zusätzliche Spleißvariante ohne die IIIcS Domäne, ohne das zehnte Typ I (I<sub>10</sub>) und das fünfzehnte Typ III Segment (III<sub>15</sub>) wurde berichtet <sup>59</sup>. So erscheint die IIIcS Region in 5 verschiedenen Varianten während des Spleißens <sup>60, 61</sup>.



**Abbildung 1-13: Schematische Darstellung des FN Moleküls.** FN enthält Typ I, II und III Domänen, die unter anderem Zellen, Kollagen, Integrine und Fibrin binden können. Aufgrund von alternativem Spleißen kann FN in 20 verschiedenen Isoformen vorliegen. Modifiziert nach Hynes <sup>51</sup>.

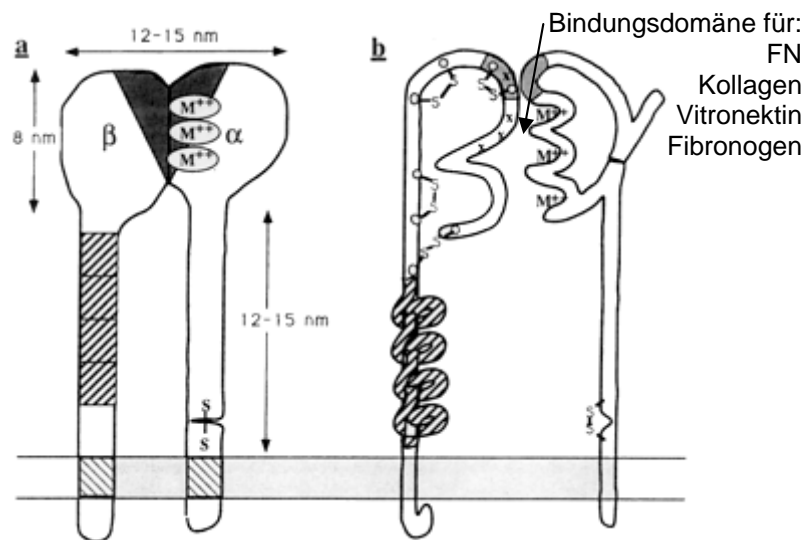
FN wird von unterschiedlichen Zellen produziert. Lösliches Plasma-FN, das weder die ED-A noch die ED-B Domäne besitzt, wird vor allem von Hepatozyten sezerniert. Dafür enthalten Plasma-FNe eine Vielzahl von verschiedenen IIIcS-Regionen. Eine zellassoziierte Form des FN (zelluläres Fibronectin genannt) wird von Zellen wie Fibroblasten, Epithelzellen und Makrophagen synthetisiert und enthält variable Mengen an ED-A, ED-B und IIIcS.



Die FN Spleißformen weisen deutliche funktionelle Unterschiede auf. Die Expression von ED-A und ED-B enthaltendem FN ist während Wundheilungsprozessen und physiologischen und pathophysiologischen Konditionen<sup>62</sup> bei Leber-, Nieren- und Lungenfibrose<sup>63-65</sup>, nach Herztransplantation<sup>66</sup>, bei vaskulärer Intimalproliferation<sup>67</sup> und vaskulärem Bluthochdruck<sup>68</sup> signifikant erhöht. Das ED-B Segment - keine andere Domäne - ist ein Marker für Angiogenese<sup>69</sup>. Die Spleißvariante ED-A spielt eine Rolle bei der Regulation der Zellproliferation<sup>64</sup> und -differenzierung der Adipozyten und Fibroblasten in Myofibroblasten<sup>70, 71</sup>. Bei der Zellmigration ist ED-A enthaltendes FN wirksamer als FN ohne ED-A Domäne. Manabe *et al.* konnten zeigen, dass eine erhöhte Migration von humanen HT1080 Fibrosarkomzellen durch eine vermehrte Bindung von ED-A enthaltendem FN an Integrin  $\alpha 5\beta 1$  hervorgerufen wurde<sup>72</sup>. Zudem ist diese FN Spleißform fähig, TLR4 zu aktivieren<sup>73</sup>. Ein Teil der nicht homologen IIIcS Domäne (VLA-4) ist eine Bindungsstelle für unterschiedliche Zellen und ein Ligand für Integrin  $\alpha 4\beta 1$ <sup>74-76</sup>.

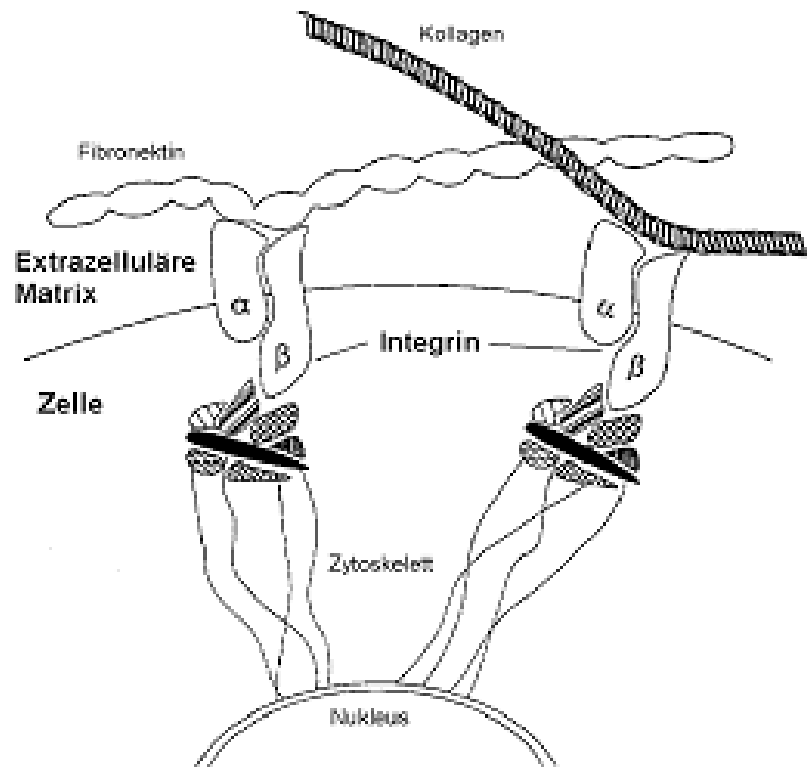
### 1.8.2 Integrine

Die Integrine gehören zur Familie von heterodimeren Transmembranrezeptoren und bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, die nicht kovalent miteinander verbunden sind (Abbildung 1-14). Integrine haben eine kurze intrazelluläre Transmembrandomäne, die eine Verbindung zum Zytoskelett herstellt, und eine lange extrazelluläre Domäne, die als Rezeptor fungiert. Unter anderem die  $\alpha$ -Kette weist eine große Heterogenität auf, so dass über 20 unterschiedliche Integrine bekannt sind, die sich aus Kombination von verschiedenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten ergeben.



**Abbildung 1-14: Die Struktur der Integrine.** (a) Übersichtsdarstellung des Aufbaus, wie er durch Elektronenmikroskopie bekannt ist: die Cystein-reichen repeats der  $\beta$ -Untereinheit (schraffiert) und die Metallbindungsstellen in der  $\alpha$ -Untereinheit ( $M^{2+}$ ). Der schwarz ausgefüllte Bereich repräsentiert die Liganden-Bindungsregion, die von beiden Untereinheiten gebildet wird. (b) verdeutlicht den chemischen Aufbau der Polypeptid-Ketten (nach Hynes <sup>77</sup>)

Integrine vermitteln Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen <sup>77</sup> und interagieren mit FN (Abbildung 1-15) an der III14-V Region und an der zentralen zellbindenden Domäne (*central cell-binding domain*, CCB<sub>D</sub>). CCB<sub>D</sub> ist die Hauptdomäne für die Zelladhäsion im FN Molekül und enthält das Arg-Gly-Asp (RGD) Motiv <sup>78</sup>. Dieses RGD Motiv steigert intestinale epitheliale Restitution <sup>79</sup> und wird durch verschiedene Integrine wie  $\alpha 5 \beta 1$ ,  $\alpha v \beta 1$ ,  $\alpha v \beta 3$ ,  $\alpha v \beta 5$ ,  $\alpha v \beta 6$ ,  $\alpha 11 \beta 3$  und  $\alpha 8 \beta 1$  erkannt. Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  ist dabei spezialisiert auf die Bindung an FN und stellt somit den Haupt-FN-Rezeptor dar <sup>80</sup>. Interaktionen der Integrine mit dem extrazellulären Matrixprotein FN sind für die Vermittlung von Zelladhäsion und Migration von entscheidender Bedeutung.



**Abbildung 1-15: Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen bei der Zelladhäsion an den EZM-Proteinen FN und Kollagen.** Es kann durch den Kontakt von zellulären Integrinen und Adhäsionsproteinen der EZM zu einer Neuordnung des Zytoskeletons kommen, das zu einer Nukleus-Signalübermittlung und einer Beeinflussung der Genexpression führt (nach Yue <sup>81</sup>).

### 1.8.3 Wachstumsfaktoren und Zytokine

Wachstumsfaktoren werden von einer Vielzahl von Immun- und Nichtimmunzellen sezerniert. Sie sind wichtige und potente Regulatoren der Migration von Myofibroblasten und steuern die Phänotypveränderung von Zellen, so dass eine Gewebsneubildung im Rahmen der Wundheilung oder Morphogenese hervorgerufen wird <sup>48</sup>. Wachstumsfaktoren modulieren die Proliferation und Differenzierung von Zellen. Sie spielen zudem eine wichtige Rolle bei Abwehrmechanismen und Entzündungsprozessen im Gastrointestinaltrakt, da sie sowohl für die Ablagerung als auch für die Degradation von extrazellulärer Matrix verantwortlich sind <sup>82</sup>. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von

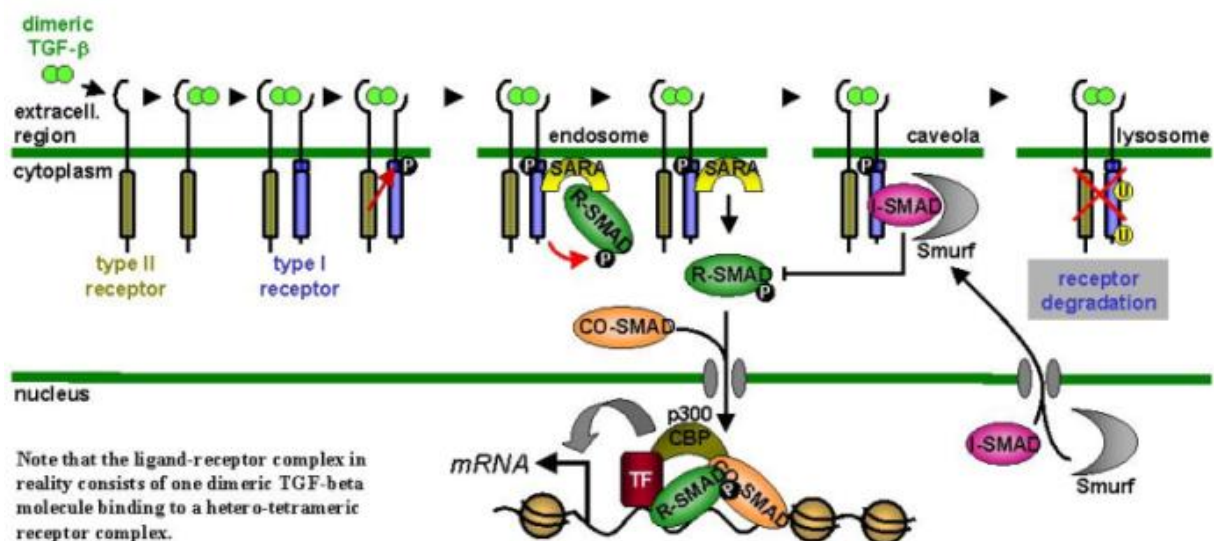
Wachstumsfaktoren und Zytokinen im Darm vorhanden ist <sup>83-88</sup> und somit ein kompliziertes Netzwerk an interagierenden Faktoren existiert.

### **1.8.3.1 Transforming Growth Factor (TGF- $\beta$ )**

TGF- $\beta$  ist in viele verschiedene physiologische Prozesse wie embryonale Entwicklung, Zellproliferation <sup>89-91</sup>, Zellmigration <sup>92-95</sup>, Zelldifferenzierung <sup>92-96</sup>, extrazelluläre Zellmatrixdeposition <sup>94, 95, 97, 98</sup> und Immunantworten <sup>99</sup> involviert. Da TGF- $\beta$  von einer Vielzahl von Zellen wie Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten sezerniert wird, nimmt man an, dass es eine entscheidende Rolle während der Embryogenese, der Hauptantwort bei Tumoren und der Wundheilung nach Gewebsentzündung durch Immun- und Nichtimmunreaktionen <sup>100</sup> spielt.

Das Zytokin TGF- $\beta$  kommt in drei Isoformen (TGF- $\beta$ 1, 2 und 3) vor. Alle drei Spleißformen sind verantwortlich für die Inhibition der Proliferation in den meisten Zelltypen und für die Induktion der Apoptose in Epithelzellen. Gleichzeitig stimulieren sie mesenchymale Zellen zur Proliferation und zur Produktion von extrazellulärer Matrix. Zudem induzieren sie eine fibrotische Antwort in einer Vielzahl von Zellen. Somit ist TGF- $\beta$  ein wichtiger Vermittler in vielen fibrotischen Krankheiten wie Lungen-, Leberfibrose oder chronischer Pankreatitis <sup>99</sup> oder stenosierendem MC <sup>101</sup>. In fibrotischem Gewebe und Regionen mit erhöhten extrazellulären Matrixablagerungen steigt die TGF- $\beta$  Expression, besonders die der Isoform TGF- $\beta$ 1 steigt stark an <sup>99</sup>. TGF- $\beta$  verändert die Balance zwischen Synthese und Degradation der extrazellulären Matrix. Es induziert einen Anstieg der Synthese von Matrixkomponenten bei gleichzeitigen Hemmung der Matrix-proteolytischen Aktivität

TGF- $\beta$  wird als Proform synthetisiert und durch multiple Mechanismen aktiviert. Das aktivierte TGF- $\beta$  kann dann an seine Rezeptoren binden (Abbildung 1-16). Die dadurch aktivierten Rezeptoren phosphorylieren und verbinden die zytoplasmatischen Smad Proteine. Danach wandern die Smad Komplexe in den Zellkern und fungieren dort als Transkriptionsfaktoren<sup>99, 102</sup>.



**Abbildung 1-16: Schematische Darstellung des TGF- $\beta$ -Signalwegs.** TGF- $\beta$  bindet an seine Rezeptoren, die dadurch aktiviert werden und die zytoplasmatischen Smad Proteine phosphorylieren und verbinden. Die Smad Komplexe wandern in den Zellkern und fungieren dort als Transkriptionsfaktoren. Quelle: [www.reactome.org](http://www.reactome.org)

TGF- $\beta$  ist auch ein potentes Chemoattraktants für humane Hautfibroblasten. Intakte Disulfidbrücken und wahrscheinlich die dimere Struktur von TGF- $\beta$  sind entscheidend für die Fähigkeit die Fibroblastenmigration zu stimulieren, da eine Reduktion an TGF- $\beta$  in einem markanten Verlust der chemoattraktiven Eigenschaften resultiert<sup>100</sup>.

TGF- $\beta$ 1 stimuliert außerdem die Expression von  *$\alpha$ -smooth muscle actin* und Stressfaserformation in Fibroblasten und bewirkt damit die Differenzierung in Myofibroblasten<sup>96</sup>. Des Weiteren begünstigt in bovinen granulösen Zellen<sup>103</sup> und tubulären Epithelzellen<sup>104, 105</sup> eine Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 das Verbleiben der extra

Domäne A im Fibronektin mRNA-Transkript, in Fibroblasten außerdem das der extra Domäne B <sup>106-108</sup>.

### **1.8.3.2 Tumor Nekrose-Faktor und Interferon- $\gamma$**

In chronisch entzündlichen Entzündungen spielt das Gleichgewicht zwischen proinflammatorischen Zytokinen wie *Tumor Necrosis Factor* (TNF), Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), Interleukinen (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) <sup>109-111</sup> und antiinflammatorischen Zytokinen (IL-4, IL-10, IL-13) <sup>112, 113</sup> eine zentrale Rolle. Dieses Gleichgewicht sorgt trotz permanenter Besiedlung des Darmes durch Bakterien für eine normale intestinale Immunregulation. Bei CED überwiegt Sekretion und Transkription pro-entzündlicher Zytokine, das zu einer Störung des Gleichgewichts und der Aktivierung proinflammatorischer intrazellulärer Signalkaskaden z.B. NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-  $\kappa$ B*) führt <sup>114-116</sup>.

Diese entzündlichen Mediatoren spielen auch bei der Fibroblastenmigration eine wichtige Rolle. Während der Wundheilung oder auch im Entzündungsprozess werden die Zytokine TNF und IFN- $\gamma$  von mononukleären Zellen sezerniert. In der intestinalen Mukosa von Patienten mit MC und CU wird TNF in großen Mengen von aktivierten Makrophagen gebildet <sup>117-121</sup>. IFN- $\gamma$  scheint hauptsächlich bei einer MC-Erkrankung erhöht exprimiert zu sein <sup>117, 122</sup>. Interferone gelten in erster Linie als Inhibitoren der Zellbewegung <sup>123</sup>. Die Isoformen IFN- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  inhibieren die Migration von Hautfibroblasten dosisabhängig <sup>124</sup>. Diese durch Interferone inhibierte Migration könnte bei der Wundheilung und bei der Entstehung von Fibrosen ein wichtiger Bestandteil regulatorischer Mechanismen sein.

Über den Einfluss von TNF auf die Migration von Fibroblasten gibt es unterschiedliche Erkenntnisse. Bei Hautfibroblasten induziert TNF keine Migration

<sup>125</sup>. Es fungiert bei diesen Zellen <sup>126</sup> und bei *smooth muscle cells* der Aorta <sup>127</sup> als Chemoattraktants und Aktivator der Migration. Durch Vorinkubation mit TNF konnte das Einwandern dieser Hautfibroblasten in ein Kollagen I Gel verstärkt werden <sup>125</sup>.

Verschiedene Konzentrationen von IFN- $\gamma$  oder TNF im konditionierten Medium zeigen eine dosisabhängige Reduktion der Migration von CLPF, die aus der gesunden Mukosa von Patienten isoliert wurden. Für 3 Tage mit IFN- $\gamma$  und/oder TNF im konditionierten Medium vorinkubierte Kontroll-CLPF zeigen ein signifikant geringeres Migrationspotential als unbehandelte Zellen. Selbst nach 7 Tagen zeigen diese vorbehandelten Kontroll-CLPF ohne weitere Zugabe von Zytokinen im konditionierten Medium eine signifikant reduzierte Migration <sup>128</sup>.

#### **1.8.3.3 Platelet Derived Growth Factor**

PDGF wurde vor über 30 Jahren als mitogene Hauptkomponente des Blutes beschrieben, die jedoch in zellfreiem Serum abwesend war. PDGF wird von Thrombozyten, Megakaryozyten, Epithelzellen und Endothelzellen <sup>129-131</sup> sezerniert. Dieses unterschiedliche Expressionsmuster weist auf einen parakrinen Signalweg hin <sup>132-134</sup>. PDGF ist ein potentes Mitogen für mesenchymale Zellen wie Fibroblasten, *smooth muscle cells* und Gliazellen <sup>135-137</sup> und induziert verschiedene und wichtige Zellprozesse. So spielt es eine Rolle bei der Chemotaxis, beim Überleben, bei der Apoptose und Transformation *in vitro* <sup>138-147</sup>. Außerdem ist es *in vivo* wichtig bei der Embryonalentwicklung, der Entzündung und Wundheilung <sup>135, 148-153</sup>. Zusätzlich wird es als entscheidend bei der Tumorgenese vermutet, da das Onkogen des Affensarkomvirus eine 92-prozentige Homologie zu PDGF-B hat <sup>135, 139, 140, 142</sup>. Klinische Studien zeigten, dass eine anormale PDGF-Expression und dessen Rezeptors mit einer Vielzahl an Störungen wie Arteriosklerose, Lungen-,

Nierenfibrose, Neoplasie<sup>135-137, 139, 140, 142, 144, 145, 151, 154</sup> einher geht, so dass man von einer Rolle von PDGF in Krankheitsentwicklung und –verlauf ausgehen kann.

PDGF gehört zur PDGF/VEGF-Familie, welche durch 8 strikt konservierte Cysteinreste mit ähnlichen Zwischenabständen charakterisiert ist<sup>155, 156</sup>. PDGF erscheint aufgrund der A-, B-, C- und D-Ketten in mehreren Isoformen. Ihre Expression ist unterschiedlich reguliert<sup>136, 149, 151, 153, 155, 157-160</sup>. Die beiden Formen der PDGF A-Kette resultieren aus einem differentiellen Spleißen des Primärtranskripts. Sie werden synthetisiert, dimerisiert, am N-Terminus proteolytisch gespalten und als ein ca. 30 kDa großes Dimer von den Zellen sezerniert<sup>161, 162</sup>. Die PDGF B-Kette wird ebenfalls dimerisiert und proteolytisch gespalten, um als 24 kDa großes Dimer sezerniert zu werden<sup>163, 164</sup>. Die heterodimeren PDGF AA, BB und auch AB bestehen aus 3 Disulfidbrückenbindungen zwischen den 1. und 6., 3. und 7. sowie 5. und 8. Cysteinresten in der N-terminalen Region. Der 2. und 4. Cysteinrest ist asymmetrisch über zwei Disulfidbrückenbindungen miteinander verbunden<sup>165</sup>. Die PDGF C- und D-Proteine haben einzigartige Domänen-Strukturen mit einer N-terminalen CUB Domäne, welche Sequenzähnlichkeiten mit der CUB-Domäne von C1r/C1 und BMP-1 aufweisen<sup>166</sup> und einer C-terminalen 2-PDGF/VEGF Domäne. Obwohl diese *growth factor* Domänen eine größere Ähnlichkeit zu den VEGF als zu den PDGF aufweisen, können sie den VEGF-Rezeptor nicht aktivieren. Es ist bisher nicht bekannt, ob PDGF C- und D-Ketten Heterodimere untereinander oder zu den A- und B-Ketten bilden. Es dimerisieren lediglich die C- und D-Ketten zu PDGF-CC und PDGF-DD.

Für Fibroblasten aus den verschiedensten Organen stellen die PDGF-Isoformen (AA, AB, BB) potente Mitogene und Chemoattraktantien dar, außerdem sind sie die Schlüsselfaktoren in der Fibrogenese<sup>38, 167-173</sup>. In *in vitro* Versuchen an murinen Fibroblasten konnte interessanterweise nur PDGF-BB eine transformierende



Fähigkeit zugeschrieben werden<sup>145, 154, 174</sup>. Außerdem verstärkt PDGF seine initialen Proliferationssignale, indem das Expressionslevel an PDGF und andere Mitogenen erhöht wird<sup>175-177</sup>. PDGF reguliert zudem auch die Produktion an Kollagen<sup>178, 179</sup>, Fibronektin<sup>180</sup>, Proteoglykanen<sup>181</sup>, Hyaluronsäure<sup>182</sup> und Kollagenase<sup>183</sup>. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass PDGF sich aktiv am Gewebeumbau beteiligt, indem es essentielle zelluläre Komponenten rekrutiert und den Umsatz an extrazellulärer Matrix reguliert.

## 1.9 Bisherige Ergebnisse

Die Migration von Fibroblasten spielt bei der Gewebeformation und Wundheilung eine wichtige Rolle. Einer Schädigung des Gewebes folgt eine Reparatur mit Entzündung, Gewebeneuentstehung und Narbenbildung<sup>100</sup>. Die Fibroblastenmigration in und durch die extrazelluläre Matrix während der initialen Phase der Wundheilung erscheint als fundamentale Komponente der Wundkontraktion. Die Differenzierung und Aktivierung von Fibroblasten in Myofibroblasten ist dabei ein wichtiger Schritt. Das vorübergehende Erscheinen von Myofibroblasten ist ein Merkmal der normalen Wundheilung, aber ein andauerndes Verbleiben dieser aktivierten Zellen ist mit einer exzessiven Kollagenablagerung und Fibrose assoziiert<sup>96</sup>. Diese verlängerte Präsenz und die Überpräsentation sind Zeichen in der Pathophysiologie der Gewebsfibrose<sup>184</sup>.

In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass konditioniertes Medium von humanen CLPF die CLPF-Migration in der modifizierten Boyden Kammer induzieren kann, so wie es andere Gruppen zuvor schon mit humanen Hautfibroblasten zeigen konnten<sup>185-188</sup>. Das von den CLPF

sezernierte FN konnte im konditionierten Medium als Migration induzierender Faktor ermittelt werden <sup>189</sup>. Während eine Depletion des FN aus dem konditionierten Medium mittels Immunpräzipitation eine Hemmung der Migration bewirkte, konnte Plasma-FN in nicht-konditioniertem serumfreien Medium die Fibroblastenmigration induzieren. Dahingegen konnten verschiedene Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1 im konditionierten Medium die Migration nur steigern <sup>190</sup>, während die entzündlichen Mediatoren IFN- $\gamma$  und TNF die Migration hemmten <sup>128</sup>.

Eine differenzierte Migration der CLPF konnte ebenfalls bei CED beobachtet werden. So zeigten aus MC-Mukosa isolierte CLPF ein signifikant reduziertes Migrationsverhalten im Vergleich zu CLPF aus nicht entzündeter Kontrollmukosa <sup>128</sup>. Des Weiteren migrierten CLPF, die aus Fisteln von MC-Patienten isoliert wurden, im Vergleich zu einfach entzündeten MC-CLPF weniger und MC-CLPF aus Stenosearealen mehr <sup>191</sup>. Dieser beobachtete Migrationsunterschied ging mit einer verminderten Phosphorylierung der *focal adhesion kinase* (FAK) einher <sup>128</sup>. FN ist dabei der Induktor der FAK-Phosphorylierung über Integrinaktivierung.

Subtraktive Hybridisierungen mit der cDNA von 3 verschiedenen CLPF-Kulturen von Patienten mit stenosierendem MC und von 4 Kontrollpatienten zeigten, dass in Stenosearealen von Patienten mit MC FN-mRNA vermehrt exprimiert wurde <sup>192</sup>. Es konnten außerdem vermehrt mRNA-Transkripte der FN-Domäne B nachgewiesen werden.

## 2. Arbeitsziele

Dieser Arbeit vorangegangene Migrationsversuche zeigten, dass CLPF abhängig von dem Ort ihrer Isolation und vom Entzündungsgrad der Mukosa vermindert oder gesteigert migrierten. Während CLPF aus Fistelgewebe von Patienten mit MC weniger migrierten als CLPF aus einfach entzündeter Mukosa, zeigten CLPF aus Stenosearealen ein höheres Migrationspotential. Im Vergleich zu CLPF, die aus der Mukosa von MC-Patienten isoliert wurden, zeigten Kontroll-CLPF ein stärkeres Migrationsverhalten.

1. Da in fibrotischem MC-Gewebe im Vergleich zu Kontrollgewebe mehr FN-mRNA nachzuweisen und FN der Migration-induzierende Faktor ist, sollten vergleichende Migrationsanalysen zwischen Kontroll-CLPF und MC-CLPF aus Stenosearealen in der modifizierten Boydenkammer durchgeführt werden, da dies bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht untersucht wurde.
2. Da neben der vermehrten mRNA-Expression von FN auch eine stärkere mRNA-Expression von FN ED-B bei subtraktiven Hybridisierungen in stenosierter Mukosa von Patienten mit MC verglichen mit der Mukosa von Kontrollpatienten beobachtet wurde, sollte das Expressionsmuster von FN bei CED untersucht werden. Dabei sollte die Expression von Gesamt-FN als auch die der Spleißvarianten ED-A und ED-B analysiert werden.
3. Der Hauptoberflächenrezeptor für FN ist Integrin  $\alpha 5\beta 1$  und bei der Migration essentiell. Darum sollte auch die Expression des Integrins  $\alpha 5\beta 1$ - bei den verschiedenen CED-CLPF ermittelt werden.

Im Darm gibt es eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, welches das Vorhandensein eines komplizierten Netzwerks von vielen interagierenden Faktoren aufzeigt. Diese wichtigen und potenten Regulatoren der Migration von verschiedenen Zelltypen spielen eine wichtige Rolle bei den Abwehrmechanismen und Entzündungsprozessen im Gastrointestinaltrakt (siehe Abschnitt 1.8). Bei einer MC-Erkrankung sind die proentzündlichen Mediatoren wie IFN- $\gamma$  und TNF erhöht, während die Migration der CLPF der einfach entzündeten Mukosa im Gegensatz zu Kontroll-CLPF reduziert ist.

4. Deshalb sollten Kontroll-CLPF mit den Migration reduzierenden Zytokinen IFN- $\gamma$  und TNF behandelt und die Expression der FN Spleißvarianten bzw. der Integrine in diesem „entzündliche Milieu“ untersucht werden.

Verglichen mit Kontrollpatienten findet man in Stenosearealen von Patienten mit MC TGF- $\beta$  in erhöhten Konzentrationen. Erhöht ist auch die Migration der CLPF, die aus der stenosierte Mukosa von MC-Patienten isoliert wurden. Durch TGF- $\beta$ -Stimulation in sehr geringen Konzentrationen konnte das Migrationspotential von Kontroll-CLPF gesteigert werden.

5. Deshalb sollten quantitative mRNA- und Western Blot-Analysen an TGF- $\beta$ 1 behandelten Kontroll-CLPF hinsichtlich der FN Expression durchgeführt werden. Zudem sollte eine Veränderung der Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 Expression überprüft werden.

TGF- $\beta$ 1 steigert nicht nur die Migration, sondern beeinflusst auch das alternative Spleißen von Fibronektin, so dass die Domäne ED-A im Primärtranskript integriert bleibt.

6. Aus diesem Grund sollte die mRNA- und Proteinexpression von Gesamt-FN, ED-A und ED-B bei zwei verschiedenen höheren TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen an Kontroll-CLPF untersucht werden. Dieser Ansatz sollte zu einem für 2 Tage und zum anderen für 6 Tage durchgeführt werden, da bei Migrationsversuchen an CLPF in der modifizierten Boydenkammer ein zweiphasiger Effekt beobachtet werden konnte.

FAK und deren Phosphorylierung spielen eine wichtige Rolle in der Zellmigration. FAK verbindet Signaltransduktionswege, die über Wachstumsfaktorrezeptoren und Integrine vermittelt werden und kann deshalb sowohl die Integrin als auch die Wachstumsfaktoren-vermittelte Migration beeinflussen (siehe Abschnitt 1.7).

7. Es sollte deshalb in dieser Arbeit mittels Western Blot untersucht werden, ob FAK-Protein sowohl die Autophosphorylierung von FAK am Tyrosin-Rest 397 im Verlauf der Migrationsinduktion einer Regulation unterliegt. Dafür sollten für 6 Tage Kontroll-CLPF mit und ohne TGF- $\beta$ 1 behandelt und in einem Verwundungsexperiment 4 h nach Verwundung des konfluenten *Monolayers* lysiert werden. Die FAK-Expression, die FAK-Autophosphorylierung sowie die FN Expression sollte abhängig von einer steigenden Wachstumsfaktorkonzentration untersucht werden. Durchgeführt werden sollten diese Untersuchungen mit Kontroll-CLPF.

Hintergrund dieses Experiments ist es aufzuzeigen, ob Wachstumsfaktoren wie PDGF-AB eine durch TGF- $\beta$  unter Langzeitinkubation induzierte bereits beobachtete reduzierte Migration wieder zu restituieren ist.

### 3. Materialien

#### 3.1. Chemikalien und Kits

##### 3.1.1. Zellkultur

Amphotericin B	Bristol-Myers Squibb GmbH, München
<i>Bovine Serum Albumin (BSA)</i>	Biomol, Hamburg
Ciprobay ® 200	Bayer, Leverkusen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNase I	Roche, Mannheim
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose</i>	PAA, Pasching, Österreich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötales Kälberserum (FCS)	PANSystems, Aidenbach
Gentamycin	PAA, Pasching, Österreich
<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$	PAA, Pasching, Österreich
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kollagenase	Sigma-Aldrich, Steinheim
MEM-Vitamine	PAA, Pasching, Österreich
Natriumpyruvat	PAA, Pasching, Österreich
Nicht essentielle Aminosäuren	PAA, Pasching, Österreich
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$	Gibco, Karlsruhe
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) mit $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$	Biochrome, Berlin
Penicillin/Streptomycin-Mischung	PAA, Pasching, Österreich

Trypanblau	Biochrome, Berlin
Trypsin ohne EDTA	PAA, Pasching, Österreich

### 3.1.1.1 Zytokine, Wachstumsfaktoren

Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )	Chemicon, Hofheim
Tumor Nekrose Faktor (TNF)	Tebu Bio, Offenbach
<i>Transforming Growth Factor</i> (TGF- $\beta$ 1)	Tebu Bio, Offenbach
<i>Platelet Derived Growth Factor</i>	R&D Systems, Wiesbaden

### 3.1.1.2 Kit

Hemacolor-Schnellfärbekit	Merck, Darmstadt
---------------------------	------------------

### 3.1.2 Immunhistochemie

Aceton	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	PANSystems, Aidenbach
Mayer's Hematoxylin-Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vector® NovaRED	Linaris, Wertheim
Vectastain ABC-Kit	Linaris, Wertheim

### 3.1.2.1 Antikörper

Maus anti-human Fibronectin	Pharmingen, Hamburg
Maus anti-human Fibronectin ED-A [IST-9]	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Maus anti-human Fibronectin ED-B [PhiloMab-2]	Philogen, Genova, Italien
Biotin-SP-konjugierter Ziege anti-Maus IgG	Dianova, Hamburg



**3.1.2.2 Isotypkontrollen**

Maus IgG1 kappa [ MOPC-21]	Sigma-Aldrich, Steinheim
Maus IgG1	R & D Systems, Wiesbaden

**3.1.3 Durchflussszytometrie (FACS)**

Fötales Kälberserum (FCS)	PANSystems, Aidenbach
---------------------------	-----------------------

**3.1.3.1 Antikörper**

FITC-konjugierter Maus anti-CD49e	DPC Biermann
PE- konjugierter Maus anti-CD29	DPC Biermann

**3.1.3.2 Isotypkontrollen**

FITC-konjugierter Maus anti-IgG2b	Caltag, Burlingame, USA
PE- konjugierter Maus anti-IgG1	Caltag, Burlingame, USA

**3.1.4 RNA-Prozedur****3.1.4.1 RNA-Isolation**

RNeasy® Kit	Qiagen, Hilden
QiaShredder	Qiagen, Hilden
<i>RNase-free DNase-Kit</i>	Qiagen, Hilden

**3.1.4.2 RT-PCR**

Reverse Transcriptase System	Promega, Madison, USA
------------------------------	-----------------------

### 3.1.4.3 Primer und Sonden

Gene Checker™ Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
GAPDH	Applied Biosystems, Forster City, USA

Name	Primer/Sonde	Sequenz 5' → 3'
ED-A	Forward	AGGACTGGCATTCACTGATGTG
	Reverse	GTCACCCTGTACCTGGAACTTG
	Probe	FAM-TGTCGATTCCATCAAAATTGCTTGGGA-TAMRA
ED-B	Forward	GGTGGACCCCGCTAAACTC
	Reverse	ACCTTCTCCTGCCGCAACTA
	Probe	FAM-TCCACCATTATTGGGTACCGCATACCA-TAMRA
FN total	Forward	CCAGACACCATGGTGTCA
	Reverse	TGAGTAACGCACCAGGAAGTTG
	Probe	FAM-CTGGGCTCCACCCCATCCATT-TAMRA
Integrin $\alpha 5$	Forward	CGCCCCATCGTGTCCGCTAGT
	Reverse	CGGCTCTGGTTCACGGCAAAGTA
Integrin $\beta 1$	Forward	GCCGGGTTTCACTTTGCTGGAGAT
	Reverse	CCCTGTTCCATTACCCCGTTCTT

### 3.1.4.4 Polymerasen

HotStar Mastermix	Qiagen, Hilden
Universal Master Mix	Applied Biosystems, Forster City, USA

### 3.1.5 SDS-PAGE und Western Blot

#### 3.1.5.1 RIPA-Lysepuffer

Tris	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Deoxycholsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS	Merck, Darmstadt

<i>complete proteinase inhibitor mixture</i>	Roche, Mannheim
--	-----------------

### **3.1.5.2 Proteinbestimmung**

BSA	Biomol, Hamburg
Bicinchoninsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Copper(II) Sulfat Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim

### **3.1.5.3 Größenstandard**

<i>Rainbow markers</i>	Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien
------------------------	--

### **3.1.5.4 SDS-PAGE Gele**

30% Acrylamid Mix	Roth, Karlsruhe
Tris	Merck, Darmstadt
SDS	Merck, Darmstadt
APS	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim

### **3.1.5.5 Running-Puffer**

Tris	Merck, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS	Merck, Darmstadt

### **3.1.5.6 Transfer-Puffer**

Tris	Merck, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Fluxa, Buchs

**3.1.5.7 Wasch-Puffer**

Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim

**3.1.5.8 Detektion**

ECL-Plus	Amersham Life Science, Braunschweig
Ponceau S	Fluxa, Buchs

**3.1.5.9 Stripping**

Re-Blot Plus, Western Blot Recycling Kit	Chemicon, Hofheim
--	-------------------

**3.2 sonstige Verbrauchsmaterialien**

Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup>	Falcon, Heidelberg
384-Well Platte	Abgene, Epsom, Großbritannien
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
<i>Cellscraper</i>	Costar, Bodenheim
50 ml Reaktionsgefäße	Falcon, Heidelberg
Zellkulturschalen 75 cm <sup>2</sup>	Costar, Bodenheim
15 ml Reaktionsgefäße	Falcon, Heidelberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbrecht
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Ritips	Ritter, Schwabmünchen
Pipetten	Costar, Cambridge, USA
Kryo-Reaktionsgefäße	Nunc, Roskilde, Dänemark
5100 Cryo 1°C Freezing Container	Nunc, Roskilde, Dänemark
Deckgläser 24x60 mm	Laborcenter, Nürnberg
Gel-Kassetten	Invitrogen, Karlsruhe

Gel-Kämme	Invitrogen, Karlsruhe
Hyperfilm ECL	Amersham, Braunschweig
Immersionsöl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kanülen	Becton-Dickinson, San Jose, USA
Kapillarspitzen	Biozym, Hessisch Oldendorf
Nitrozellulosemembran-Filterpapier- <i>Sandwich</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Objektträger	Laborcenter, Nürnberg
Pinzetten	Labor Schubert&Weiß, Iphofen
Polycarbonat-Membranen 25x80 mm (8 µm Poren)	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
Spritzen	Becton-Dickinson, San Jose, USA
Stericup Vakuum-Filtereinheiten mit Auffanggefäß	Millipore, Essen
Sterilfilter Acrodisc 0,2 µm	Gelman Sciences, Michigan, USA

### 3.3 Geräte

ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Megaforce 1.0R	Kendro Heraeus, Nürnberg
Epics XL.MCL	BeckmanCoulter, Krefeld
Handbohrgerät Xenox	Proxxon GmbH, Niersbach
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Analysenwaage <i>sartorius analytica</i> A120S	Sartorius, Göttingen
Autoklav sanoclav	Wolf, Geislingen
Bioforce 15R	Kendro Heraeus, Nürnberg
Bioforce pico	Kendro Heraeus, Nürnberg
BioMax TranScreen HE	Kodak, Rochester, USA

Brutschränke	Kendro Heraeus, Nürnberg
Digitale Bildverarbeitungsanlage	Visitron Systems, München
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
ELISA-Reader	MWG Biotech, Denkendorf
Entwickler	AGFA, München
Filmkassette	Olympus, Stuttgart
Laborwaage	Sartorius, Göttingen
<i>Lamin Air</i> Sterilbank	Kendro Heraeus, Nürnberg
Liquitherm FV, Heizbad	Labora Mannheim, Mannheim
Magnetrührer	Heidolph, Kelheim
Mikroskop	Leica, Wetzlar
Mikroskop	Olympus, Stuttgart
Millipore Wasserfiltrationsanlage	Millipore, Eschhorn
Modifizierte Boyden Kammer	Receptor Technologies Ltd., Adderbury, Großbritannien
Neubauer Zählkammer <i>Improved</i>	Blaubrand, Wertheim
pH-Meter	Beckmann, München
Xcell II Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.4 Software

Für die Ermittlung von geeigneten Primern und Sonden für die real-time PCR:

Primer Express 1.5 software (PE Applied Biosystems, Forster City, USA)

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen mittels BCA-Test:

SOFTmax PRO (Molecular Devices, USA)

## 4. Methoden

### 4.1 Isolierung, Lagerung und Kultur von primären humanen Colon lamina propria Fibroblasten (CLPF)

#### 4.1.1 Isolierung und Kultivierung von CLPF

Primäre Colon lamina propria Fibroblasten wurden aus Biopsien und chirurgischem Material isoliert. Dafür wurde die Mukosa in 1mm große Stücke geschnitten, während die Biopsien direkt verwendet wurden. Die intestinalen Epithelzellen wurden in 10 ml *Hanks' Balanced Salt Solution* ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  und 2 mM 0,5 M EDTA bei 37°C für 20 min durch Schütteln entfernt. Das verbliebene Gewebe wurde anschließend in 1ml PBS mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  mit 1 mg/ml Kollagenase, 0,3 mg/ml DNase I und 2 mg/ml Hyaluronidase für 30 min bei 37°C verdaut. Der Kollagenase-Verdau der isolierten Zellen wurde mit 10% FCS in *Dulbecco's Modified Eagle's* Medium abgestoppt. Durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 4500 rpm, 5 min) und Resuspension wurden die isolierten Zellen gewaschen und anschließend in 5 ml sterilem FCS-haltigem Medium in einer 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nicht adhärente Zellen wurden durch Wechsel des Mediums entfernt.

Sobald die Zellen konfluent gewachsen waren, wurden sie vom Flaschenboden abgelöst (0,5 % Trypsin in PBS), zentrifugiert (Megafuge, 1200 rpm, 10 min, RT), in eine Petrischale (100 x 20 mm) überführt und in einem Inkubator weiterkultiviert. Das Medium wurde alle 4 Tage gewechselt bis die Zellen dicht genug gewachsen waren. Die in den Versuchen der vorliegenden Arbeit verwendeten CLPF wurden in den Passagen 3 bis 10 eingesetzt, da die Fibroblastenpopulationen nach der dritten Passage nicht mehr durch Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen oder Epithelzellen verunreinigt waren (S. N. Leeb, persönliche Mitteilung).

Kontroll-CLPF wurden aus der intestinalen Mukosa von Patienten isoliert, bei denen eine chronisch entzündliche Darmerkrankung ausgeschlossen werden konnte. Außerdem wurden CLPF aus dem Intestinum von Morbus Crohn Patienten isoliert. Eine Patientencharakteristik ist in Tabelle 4-1 zusammengestellt.

Zusammensetzung des verwendeten Zellkultur-Mediums:

500 ml	<i>DMEM high glucose</i>
50 ml	FCS (10x)
5 ml	MEM nicht essentielle Aminosäuren (100x)
5 ml	Natriumpyruvat (100 mM)
5 ml	Penicillin-Streptomycin-Mischung (10 000 IE, 10 mg/ml)
5 ml	MEM Vitamine (100x)
2 ml	Ciprobay (2 mg/ml)
0.5 ml	Gentamycin (50 mg/ml)
0.5 ml	Amphotericin B (1 mg/ml)



**Tabelle 4-1: Zusammenstellung verwendeter Patienten für die Herstellung von primären CLPF**

Nr.	Geschlecht	Alter	Erkrankung	Entzündung/Fistel/Stenose	Behandlung
44	m	34	MC	-	Azathioprin, 5-ASA
124	f	36	MC	-	-
140	f	59	MC	-	-
62	m	27	MC	Stenose	5-ASA
67	f	32	MC	Stenose	-
105	f	34	MC	Stenose	Steroide
123	f	36	MC	Stenose	-
72	f	26	MC	Fistel	5-ASA, Steroide
141	f	51	MC	Fistel	Steroide
142	m	35	MC	Fistel	Azathioprin
143	f	33	MC	Fistel	Azathioprin, 5-ASA
149	m	40	MC	Fistel	Azathioprin
152	f	46	MC	Fistel	5-ASA, Azathioprin
153	f	44	MC	Fistel	Azathioprin, Steroide
94	f	59	Transversum Karzinom	-	-
96	f	69	Polyp	-	-
97	m	32	-	-	-
98	m	64	Rektumkarzinom	-	-
107	m	52	-	-	-
110	m	58	Transversum Karzinom	-	-
121	f	74	Colonkarzinom	-	-
148	m	64	Polyp	-	-
178	w	25	-	-	-
181	m	43	Colonkarzinom	-	-
186	m	72	Colonkarzinom	-	-
187	m	26	-	-	-
191	w	25	-	-	-
194	w	67	-	-	-
199	m	51	-	-	-
200	w	68	-	-	-

#### 4.1.2 Einfrieren der CLPF

Die frisch isolierten, auf einer Petrischale dicht gewachsenen CLPF wurden erneut mit Trypsin behandelt und 1:5 in neuen Petrischalen kultiviert. Nachdem auch diese Fibroblasten wieder konfluent den Schalenboden bedeckten, wurden sie mit Trypsin abgelöst und durch Zentrifugation (Megafuge, 1200 rpm, 10 min) sedimentiert. Das Zellpellet wurde mit 5 ml Einfriermedium (CLPF-Medium mit 20% FCS und 10% DMSO) resuspendiert und in fünf 1,8 ml Kryo-Reaktionsgefäße überführt. Diese Röhrchen wurden sofort in eine spezielle Einfrierbox gestellt und bei -80°C eingefroren, wobei sich die Innentemperatur der Box um 1°C pro min senkte. Später konnten die eingefrorenen CLPF in flüssigen Stickstoff für eine längere Aufbewahrung umgelagert werden.

### 4.1.3 Auftauen der Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden möglichst schnell aus dem Flüssigstickstofftank entnommen, mit 37°C warmen Medium resuspendiert und für 5 min zentrifugiert (Megafuge, 1200 rpm). Das im Überstand befindliche DMSO, das bei RT toxisch auf die Zellen wirkt, wurde entfernt und die Zellen mit 10 ml Fibroblasten-Medium in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellflasche kultiviert.

### 4.1.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellen wurden in der modifizierten Neubauer-Zählkammer gezählt. Auf einer Glasplatte sind auf einem leicht abgesenktem Mittelstreifen zwei gegenüberliegende quadratische Zählnetze eingraviert. Durch Aufbringen eines Spezial-Deckglases entsteht eine definierte Kammerhöhe von exakt 0,1 mm (Abbildung 4-1). Das Zentrum der kreuzförmig verstärkten Glasgravur stellt das so genannte Thoma-Netz (Abbildung 4-2) dar. Das Zählnetz von 3 mm Seitenlänge und 9 mm<sup>2</sup> Fläche enthält Großquadrate mit je 1 mm<sup>2</sup> Fläche. In den vier sich diagonal gegenüberliegenden nicht vom Thoma-Netz durchzogenen Großquadraten wurden die Zellen gezählt. Die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension ergab sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} * 10^4 = \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$$

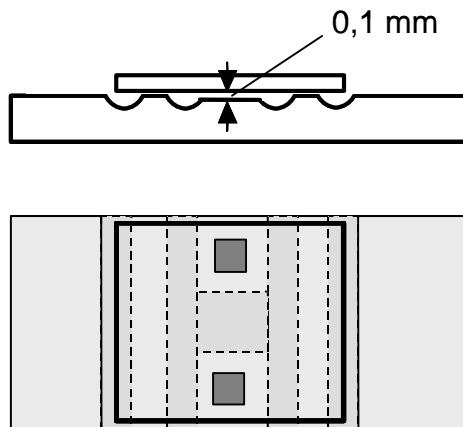


Abbildung 4-1: Neubauer-Zählkammer  
Zählkammer<sup>193</sup>.

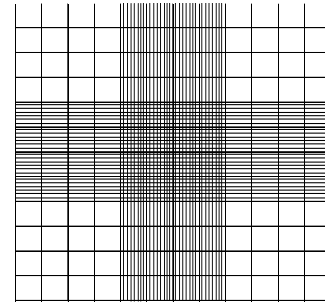


Abbildung 4-2: Zählnetz der Neubauer-

## 4.2 Herstellung von konditionierten Medien

Als konditionierte Medien wurden Zellkultur-Überstände bezeichnet, die für eine bestimmte Zeit auf den Zellen belassen wurden.

Konfluent gewachsene CLPF wurden zwei Mal mit Medium ohne FCS gewaschen, um nicht adhärente Zellen und Reste von FCS zu entfernen. Schließlich wurden die Zellen mit diesem FCS-freien Medium für 24 h inkubiert. Der Zellüberstand wurde gepoolt, bei -20°C eingefroren und für Migration-induzierende Experimente herangezogen.

Zusammensetzung des verwendeten Zellkultur-Mediums zur Herstellung von konditionierten Medien:

- 500 ml *DMEM high glucose*
- 5 ml MEM nicht essentielle Aminosäuren (100x)
- 5 ml Natriumpyruvat (100 mM)
- 5 ml Penicillin-Streptomycin-Mischung (10 000 IE, 10 mg/ml)

5 ml	MEM Vitamine (100x)
2 ml	Ciprobay (2 mg/ml)
0.5 ml	Gentamycin (50 mg/ml)
0.5 ml	Amphotericin B (1 mg/ml)

## 4.3 Migrationsassay

### 4.3.1 Allgemeines zur Methode

Zur Quantifizierung der Migration von CLPF wurde die modifizierte 48-*well*-Boyden-Kammer verwendet. So konnten 48 Bestimmungen zur gleichen Zeit mit wenigen Zellen und geringen Volumina von den zu testenden Substanzen durchgeführt werden. Diese Methode basiert auf der Fähigkeit, dass Zellen aktiv durch Filterporen einer definierten bestimmten Größe wandern können.

### 4.3.2 Beschreibung der Technik

In die Bodenplatte der modifizierten Boyden Kammer wurden pro *Well* 30 µl serumfreies Medium mit 25 µg/ml FN luftblasenfrei einpipettiert. Für jede zu testende CLPF-Kultur wurden 6 Wells vorgesehen, um die Genauigkeit des Versuchs zu erhöhen. Eine Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 8 µm wurde auf die Platte gelegt, die Deckplatte mit Silikondichtung aufgesetzt und festgeschraubt. Für die Einstellung des pH-Werts des konditionierten Mediums auf 7,4 wurde die Kammer in den Inkubator bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> gestellt. Nach 30 min wurden schließlich 200.000 CLPF pro 50 µl 1 % BSA/CLPF-Medium in das obere Kompartiment luftblasenfrei einpipettiert. Durch eine 6 stündige Inkubationszeit waren ein Teil der Zellen durch die Membran auf die andere Seite gewandert.

Die Kammer wurde aus dem Brutschrank entnommen und zerlegt. Die Membran wurde drei Mal abwechselnd mit PBS gewaschen und mit einem Gummischaber von nicht migrierten Zellen befreit.

#### **4.3.2 Färben der migrierten Zellen auf der Membran**

Nach kurzem Trocknen wurden die migrierten Zellen für 5 sec mit Methanol des Hemacolor-Schnellfärbekit (Lösung 1) auf der Membran fixiert und dann für 3 sec in eine Färbelösung nach „Giemsa“ getaucht. Diese Lösung 2 enthält Methanol als Lösungsmittel, Glyzerin als Stabilisator und Azur(II)-Eosin und Azur II als saure Farbstoffe, mit den basischen azidophilen Zellproteinen eine stabile Verbindung mit charakteristischer Färbung bilden. Die dritte Lösung, in die die Membran 15 sec getaucht wurde, ist eine Farblösung nach „May-Grünwald“, die eosinsaures Methylenblau als basischen Farbstoff und Glyzerin als Stabilisator gelöst in Methanol enthält. Der basische, positive Ladung besitzende Farbstoff lässt die sauren und basophilen Zellbestandteile mit negativer Ladung wie die DNA und RNA in wässriger Lösung blau anfärben. Zum Schluss wurde die Membran in PBS gewaschen. Die getrocknete Membran wurde mit Immersionsöl auf einem Objektträger fixiert. Für die Auswertung wurden bei 400-facher Vergrößerung unter einem Durchlichtmikroskop vier zufällige mikroskopische Felder in jedem Well gezählt.

## 4.4 Stimulation von CLPF mit IFN- $\gamma$ , TNF und TGF- $\beta$ 1

### 4.4.1 Stimulation mit IFN- $\gamma$ , TNF und TGF- $\beta$ 1

Kontroll-CLPF wurden auf Petrischalen ausgesät und im Inkubator (37°C, 10% CO<sub>2</sub>) kultiviert, bis eine 80%-ige Konfluenz erzielt wurde. Die Zellen wurden zwei Mal mit serumfreien Medium gewaschen und mit gleichem Medium und Zusätzen versehen. Je 8 Petrischalen wurden mit 10 ng/ml IFN- $\gamma$ , 20 ng/ml TNF, 10 ng/ml IFN- $\gamma$  und 20 ng/ml TNF bzw. 20 pg/ml TGF- $\beta$ 1 in 6 ml Medium sowie 8 Petrischalen nur mit serumfreien Medium stimuliert. Nach 72 h wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Zu je 3 Petrischalen wurden 400  $\mu$ l 1x RIPA + Proteinase-Inhibitor gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem *Cellscraper* vom Schalenboden abgelöst und zentrifugiert (Tischzentrifuge, 4500 rpm, 4°C). Der die Proteine enthaltende Überstand wurde bei -20°C eingefroren. Weitere 3 Petrischalen wurden direkt nach dem Waschen abgekratzt und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 350  $\mu$ l RLT-Puffer (RNeasy Kit, Qiagen, Hilden) mit  $\beta$ -ME gelöst und für die nachfolgende RNA-Isolation (siehe 4.4) bei -80°C eingefroren. Für die FACS-Untersuchung wurden die Zellen mit 0,5% Trypsin in PBS im Inkubator behandelt. Die Enzymaktivität wurde mit 1% BSA in PBS abgestoppt, die Zellen zentrifugiert und mit 1 ml 1% BSA in PBS resuspendiert. Je 5x10<sup>5</sup> Zellen wurden auf 4 Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und auf Eis inkubiert. Nach 20 min wurden die jeweiligen Antikörper und Isotypkontrollen hinzugegeben, gemischt und für weitere 30 min auf Eis im Dunklen inkubiert. Die Zellen wurden kurz mit PBS gewaschen und in 500  $\mu$ l PBS resuspendiert und für die FACS-Analyse (siehe 4.10) herangezogen.

#### **4.4.2 Stimulation mit TGF- $\beta$ 1**

Für die Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 in verschiedenen Konzentrationen wurden ebenfalls Kontroll-CLPF auf Petrischalen ausgesät und im Inkubator (37°C, 10% CO<sub>2</sub>) bis zur 80%-igen Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden zwei Mal gewaschen und mit serumfreien Medium oder mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 bzw. 50 ng/ml TGF- $\beta$ 1 in 6 ml Medium versehen. Ein Teil der Stimulation wurde bereits nach 48 h abgebrochen und die Zellen für RNA-Isolation, FACS- und Western Blot Analyse verarbeitet. Der andere Teil der Zellen erhielt nach 72 h eine Medium-Erneuerung und wurde für weitere 3 d bei 37°C inkubiert. Dann wurden auch die Zellen aufgearbeitet.

#### **4.4.3 Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 und PDGF-AB (Verwundungsassay)**

Für die Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 und PDGF-AB wurden Kontroll-CLPF zunächst für 6 d mit und ohne 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 in serumfreien Medium inkubiert. Nach dieser Zeit wurde mit einem Kamm durch die konfluenten Zellen in den Schalen Spuren gezogen. Dazu wurde der auf den Radius einer Petrischale gekürzte Kamm auf die Zellen gesetzt und dieser einmal um seine eigene Achse gedreht. Das Medium der abgekratzten Zellen wurde durch mit 0, 5, 10 oder 20 ng/ml PDGF-AB versetztes konditioniertes Medium ersetzt und die Zellen für weitere 4 h darin inkubiert. Danach wurden die stimulierten Zellen für die Untersuchung der RNA und der Proteine verwendet.

## 4.5 RNA-Isolation

Die Gesamt-RNA wurde nach Anleitung des RNeasy® Kits isoliert. Für die Gewinnung der RNA aus Gewebeproben wie Biopsien oder Präparaten (Tabelle 4-2) wurde das humane Material zunächst mit der Schere stark zerkleinert und dann in 350 µl RLT-Puffer mit  $\beta$ -ME mit einer Kanüle und Spritze homogenisiert und lysiert. Die Suspension wurde anschließend über eine QiaShredder-Säule gegeben, um die Nukleinsäuren von Zelltrümmern und Geweberesten zu trennen.

Humane CLPF wurden mit 1xPBS gewaschen, mit Trypsin oder einem *Cellscraper* vom Kulturflaschenboden abgelöst, durch Zentrifugation sedimentiert und direkt in 350 µl RLT-Puffer lysiert.

Die jeweils erhaltene Suspension wurde mit 350 µl 70% EtOH vermischt, auf eine Säule gegeben und zentrifugiert (Tischzentrifuge, 10 000 rpm). Während Proteine u.ä. sich im Filtrat befanden und verworfen wurden, verblieben die RNA und die DNA auf der Siliziummembran der Säule. Um eine DNA-freie Gesamt-RNA zu erhalten, wurden die Nukleinsäuren für 15 min mit RNase-freier DNase I behandelt. Danach wurde die Säule einmal mit 700 µl RW1-Puffer und zwei Mal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und zentrifugiert, um Reste an DNA-Stücken zu entfernen. Danach wurde die Säule auf ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt und die Gesamt-RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert.



Tabelle 4-2: Zusammenstellung verwendeter Patienten für die Herstellung von Gesamt-RNA

Nr.	Geschlecht	Alter	Erkrankung	Entzündungsgrad	Behandlung
1	m	39	MC	fibrotisch	Prednisolon
2	w	33	MC	fibrotisch	Budesonid
3	m	50	MC	fibrotisch	-
4	w	28	MC	fibrotisch	Budenofalk
5	w	62	MC	fibrotisch	Azathioprin, Steroide
6	w	36	MC	fibrotisch	Steroide, 5-ASA
7	m	50	MC	fibrotisch	
8	w	33	MC	leicht entzündet	Budesonid
9	m	66	MC	stark entzündet	-
10	m	36	MC	stark entzündet	-
11	w	51	MC	leicht entzündet	Steroide
12	m	39	MC	leicht entzündet	-
13	m	50	MC	leicht entzündet	-
14	w	28	MC	leicht entzündet	Budenofalk
15	m	36	MC	leicht entzündet	Steroide
16	w	32	MC	stark entzündet	Azathioprin, Steroide
17	w	36	MC	stark entzündet	Steroide, 5-ASA
18	m	50	MC	stark entzündet	-
19	m	41	MC	leicht entzündet	-
20	m	39	MC	leicht entzündet	Steroide
21	m	37	MC	stark entzündet	Azathioprin, Steroide
22	w	37	MC	leicht entzündet	Azathioprin
23	m	17	MC	leicht entzündet	Pantozol, Steroide
24	m	26	MC	stark entzündet	Steroide
25	w	27	MC	leicht entzündet	Azathioprin, Budenofalk
26	m	35	MC	leicht entzündet	-
27	m	24	MC	leicht entzündet	Steroide
28	w	48	MC	stark entzündet	Budenofalk, Steroide
29	m	66	MC	leicht entzündet	-
30	m	36	MC	leicht entzündet	-
31	w	51	MC	stark entzündet	Steroide
32	m	36	MC	stark entzündet	Steroide
33	m	39	MC	stark entzündet	-
34	m	73	Sigmadivertikulose	-	-
35	m	56	Sigmakarzinom	-	-
36	m	53	Sigmadivertikulose	-	-
37	w	50	-	fibrotisch	-
38	m	75	-	-	-
39	w	74	Rektumkarzinom	-	-
40	w	48	Hysterektomie	-	-
41	w	80	-	-	-
42	w	74	-	-	-
43	m	49	GvHD	-	-
44	m	65	Sigmakarzinom	-	-
45	w	32	Sigmaendometriose	fibrotisch	-
46	m	63	-	Polyp	-
47	w	68	Rektumkarzinom	-	-
48	m	60	Rektumkarzinom	fibrotisch	-
49	m	63	Transversum Karzinom	-	-
50	w	68	Rektumkarzinom	fibrotisch	-
51	m	76	-	Polyp descendens	-
52	m	51	Rektumadenokarzinom	-	-
53	m	61	Colonkarzinom	fibrotisch	-
54	m	62	Rektumadenokarzinom	-	-
55	m	68	Colonkarzinom	-	-
56	m	43	CU	-	5-ASA
57	m	36	CU	-	5-ASA
58	w	31	CU	-	5-ASA, Steroide, Azathioprin
59	w	31	CU	stark entzündet	5-ASA, Steroide, Azathioprin
60	m	38	CU	-	5-ASA
61	m	38	CU	stark entzündet	5-ASA
62	f	49	CU	stark entzündet	5-ASA
63	m	43	Sigmadivertikulitis	leicht entzündet	-
64	m	30	Sigmadivertikulitis	leicht entzündet	-
65	m	61	Sigmadivertikulitis	leicht entzündet	-

## **4.6. Photometrische Bestimmung des RNA-Gehalts**

### **4.6.1 Allgemeines zur Methode**

Die Bestimmung der RNA erfolgte mit dem RiboGreen™-Kit (Molecular Probes, Eugene, USA). Gegenüber der spektrometrischen Messung von RNA können bei dieser sensitiven Methode durch die spezifische Bindung der fluoreszierenden Ribogreen-Partikel sehr geringe RNA-Konzentrationen bis zu 1 ng/μl gemessen werden.

### **4.6.2 Beschreibung der Technik**

Die im Kit enthaltene RiboGreen-Stammlösung wurde zur Messung von Gesamt-RNA verdünnt. Für die Erstellung einer Standardkurve wurde diese ribosomale RNA in TE und RiboGreen®-Lösung verdünnt. Insgesamt wurden pro Messbereich 6 Konzentrationen verwendet (Messbereich: 1000 ng/ml, 750 ng/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 100 ng/ml, 20 ng/ml). Die Proben wurden ebenfalls mit TE und der RiboGreen®-Lösung verdünnt. Die Verdünnungen der Standardkurve und Proben wurden direkt in einer optischen Platte angesetzt, gemischt und vor dem Messen für 5 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte im Spectra Fluor Plus Fluorometer (Tecan, Crailsheim) bei einer Anregungs-Wellenlänge von 480 nm und einer Emissions-Wellenlänge von 520 nm. Die RNA Konzentration wurde anschließend mit Hilfe der Magellan Software ermittelt.

## 4.7 cDNA Synthese

Die mRNA der isolierten Gesamt-RNA wurde nach den Vorschriften des Promega Reverse Transcription System *reverse* transkribiert. Dafür wurde zunächst die 1 µg Gesamt-RNA und RNase-freies Wasser in einem Endvolumen von 9,9 µl für 10 min bei 70°C denaturiert. Nachdem die entwundene RNA auf 4°C herunter gekühlt war, wurden Puffer, Oligo-(dT)s, dNTPs, RNase-Inhibitor und *reverse* Transkriptase in einem Endvolumen von 20 µl hinzu gegeben und für 15 min bei 42°C inkubiert. Zur Abstopfung der Enzymaktivität wurde der Ansatz für 5 min bei 99°C hitzeinaktiviert und auf 4°C herunter gekühlt.

Um die Vollständigkeit der revers transkribierten mRNA zu testen, wurde eine PCR mit 5'β-Aktin, 3'β-Aktin, GAPDH, 6K Clathrin und 2K Clathrin Primern des *Gene Checker<sup>TM</sup>* Kits durchgeführt.

## 4.8 RT-PCR für Integrin α5β1 und FN

Die erhaltende cDNA wurde auf die mRNA-Expression von Integrin α5β1 und FN sowie dessen Isoformen untersucht. Mit Hilfe der verwendeten Primer (Abschnitt 3.1.5.3) erhielt man für die Integrin Untereinheit α5 ein 713 bp großes Fragment, für die Untereinheit β1 ein 390 bp großes Fragment.

Für die Amplifikation dieser Produkte wurden 2x HotStar-PCR-Mix, je 20 µM forward und *reverse* Primer, 20 ng cDNA und Nukleinsäure-freies Wasser in einem Volumen von 20 µl pipettiert und unter folgenden Konditionen behandelt: Denaturierung und Aktivierung der Polymerase bei 94°C für 15 min, gefolgt von 40 Zyklen Denaturierung bei 94°C für 30 sec, Primer und Polymerase-Anlagerung bei 55°C für 30 sec und Strangverlängerung (Elongation) bei 72°C für 60 sec und einem abschließenden

Elongationsschritt für 3 min bei 72°C. Die PCR wurde in einem TRIO-Thermoblock (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Alle erhaltenen Amplikons wurden durch Gelelektrophorese auf ihre richtige Größe hin überprüft.

## 4.9 Gelelektrophorese

Nukleinsäuren sind Polyanionen, die an jeder Monomereinheit eine Ladungseinheit tragen. Verschieden große Nukleinsäuren tragen demnach eine Ladung, die zu der Moleküllänge proportional ist. So können durch Gelelektrophorese Nukleinsäuren aufgrund der Gelmatrix nach ihrer Größe getrennt werden.

In dieser Matrix, wandern die Nukleinsäuren nach Anlegen von gleicher Spannung (in einem elektrischen Feld) zur Anode, wobei die kleineren Fragmente schneller als größere Fragmente wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist umgekehrt proportional zu dem Logarithmus der Fragmentlänge.

Aufgrund der Größe der aufzutrennenden DNA von 390 – 789 bp wurden 1,2 % Agarosegele (w/v) verwendet. Dafür wurde die entsprechende Menge an Agarose in 1x TAE-Puffer gegeben und durch Aufkochen gelöst. War die flüssige Gelmatrix auf ca. 60°C abgekühlt, wurde EtBr hinzu gegeben, in eine Gel-Kammer gegossen und die Kämme eingesetzt. Nach dem Polymerisieren des Agarosegels, wurde es in die Elektrophorese-Apparatur gesetzt und konnte mit Proben beladen werden.

Als Längenstandard diente der GeneRuler™.

Zur Sichtbarmachung der DNA-Banden wurde das Agarosegel mit UV-Licht bestrahlt. EtBr interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA Moleküle. In kurzwelligem UV-Licht fluoresziert es und macht damit die DNA sichtbar.

## 4.10 Quantitative mRNA Analyse mittels *real-time* PCR

### 4.10.1 Allgemeines zur Methode

Die *real-time* PCR ist eine Methode, um quantitativ eine Aussage über die Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnitts treffen zu können. Im Gegensatz zur herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion enthält der PCR-Ansatz eine Fluoreszenz-gebundene Sonde, die zwischen dem *down*- und *upstream*-Primer hybridisiert. An das 5'-Ende dieser Sonde ist ein Reporterfarbstoff (6-FAM oder VIC) und am 3'-Ende der Quencher-Farbstoff TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin) kovalent gebunden. Der Abstand zwischen diesen Farbstoffen ist so gewählt, dass der Quencher das Fluoreszenz-Signal des Reporters unterdrückt. Während der Amplifikation wird die bereits gebundene Sonde durch die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität verdrängt und gespalten. Dadurch verändert sich der Abstand zwischen Quencher und Reporter, so dass das Reportersignal frei wird und vom Detektor des Geräts nach jedem PCR-Zyklus erkannt werden kann. Die während der 40 Zyklen freigesetzten Fluoreszenzen werden direkt nach Beendigung der PCR mit Hilfe der *Sequence Detector software* (SDS version 2.1, PE Applied Biosystems) zur Zyklenzahl graphisch dargestellt. Im exponentiellen Bereich der erhaltenen Kurven wird eine Gerade gezogen. Die Zyklenzahl, bei der diese Basislinie überschritten wird, nennt man Ct (*Cycle threshold*)-Wert.

### 4.10.2 Beschreibung der Technik

Ein optimierter PCR-Ansatz enthielt Universal Master Mix, 750 nM des *forward* und *reverse* Primers, 250 nM der fluoreszierenden Sonde und isolierte cDNA (50 ng/Well). Alle Reaktionen wurden im Triplikat in einer 384-Well-Platte untersucht. Die

Zykler Konditionen waren: 50°C für 2 min, 95°C für 10 min, gefolgt von 40 Zyklen bei 95°C für 15 sec (Denaturierung) und bei 60°C für 1 min (Annealing und Elongation).

#### 4.10.3 Datenverarbeitung

Die Ct-Werte des *house keeping genes* GAPDH wurden von den Fibronectin-Werten subtrahiert:

$$dCt = Ct (FN Isoformen) - Ct (GAPDH)$$

Für die Auswertung bei CED wurde der Mittelwert der dCt-Werte der Triplikate ermittelt. Der dCt-Mittelwert der zusammengefassten Kontrollgruppe wurde dann von dem der gesamten MC-, stenosierten MC- oder fistulierten MC-Gruppe abgezogen:

$$ddCt = dCt (MC) - dCt (Kontrolle)$$

Die relative cDNA-Startkonzentration wurde unter Berücksichtigung der exponentiellen Amplifikation errechnet:

$$x = 2^{-ddCt}$$

Für die Auswertung von stimulierten Kontroll-CLPF wurde der Mittelwert der dCt-Werte der Triplikate ermittelt. Die stimulierten Mittel-dCt-Werte wurden von denen der unbehandelten Kontrolle der gleichen Gruppe abgezogen:

$$ddCt = dCt (stimuliert) - dCt (Kontrolle)$$

Die relative cDNA-Startkonzentration wurde unter Berücksichtigung der exponentiellen Amplifikation errechnet:

$$x = 2^{-ddCt}$$

#### 4.10.4 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse der quantitativen PCR wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test verwendet. Die *real-time* PCR Daten wurden entweder als Mittelwert  $\pm$  SEM (*standard error of the mean*) oder mit Boxplots dargestellt. Unterschiede zwischen den Mittelwerten zweier Gruppen waren bei einem p Wert < 0,05 signifikant.

### 4.11 Durchflusszytometrie

#### 4.11.1 Allgemeines zur Methode

FACS steht für *Fluorescence activated cell sorting* und beschreibt ein Verfahren zur Messung der Eigenschaften von Zellen. Die allgemeine Bezeichnung des Verfahrens lautet Durchflusszytometrie. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert.

Hierbei werden in einer Lösung befindliche Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Die Zelle emittiert dabei Streulicht und, wenn Antikörper gebunden sind, Fluoreszenzimpulse, woraus man unterschiedliche Eigenschaften der Zelle ableiten kann. Das Streulicht wird durch Zellgröße, die Struktur der Zellwand sowie intrazelluläre Bestandteile beeinflusst. Die Zellen können damit in unterschiedliche Fraktionen sortiert und gezählt werden.

Hierzu dienen zwei Parameter: Das Vorwärtsstreulicht FSC (*forward scatter*) als Maß für die Zellgröße und Seitwärtsstreulicht SSC (*side scatter*) als Maß für die Granularität (Größe und Struktur des Zellkerns etc.). Mit diesen beiden Parametern lassen sich zum Beispiel die Zellen des Blutes bereits recht gut auftrennen. Zudem kann man die Probe vorher mit Antikörpern, die mit verschiedenen fluoreszierenden

Farbstoffen verbunden sind, inkubieren. Die Antikörper sind gegen bestimmte Oberflächenmerkmale (z.B. CD = *cluster of differentiation*) gerichtet. Nach der Markierung kann dann auch die Sortierung nach diesen Merkmalen erfolgen. Durch Einsatz verschiedenfarbiger Laser kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe und damit die Informationsdichte erhöht werden.

#### 4.11.2 Beschreibung der Technik

Für die FACS-Analyse wurden die zu untersuchenden CLPF mit Trypsin oder Accutase abgelöst, ohne dabei die Oberflächenstruktur der Zellen zu zerstören. Die Zellen wurden gezählt und jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen in 250  $\mu\text{l}$  1% BSA/PBS in vier 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min auf Eis, wurden die entsprechenden Antikörper hinzu gegeben und mit den Zellen vermischt. Zur Detektion der Integrin  $\alpha 5$ -Untereinheit wurde der FITC-konjugierte anti-CD49e Antikörper (10  $\mu\text{l}$  /  $10^6$  Zellen), zum Nachweis der  $\beta 1$ -Untereinheit der PE-konjugierte anti-CD29 Antikörper (10  $\mu\text{l}$  /  $10^6$  Zellen) verwendet. Die Isotyp-Kontrollen waren FITC-konjugierter Maus anti-IgG2b (10  $\mu\text{l}$  /  $10^6$  Zellen) und PE-konjugierter Maus anti-IgG1 Antikörper (20  $\mu\text{l}$  / Ansatz). Die 30 minütige Inkubation erfolgte wieder auf Eis im Dunklen.

Die entsprechenden Proben wurden ein Mal mit PBS gewaschen und im Durchflusszytometer Epics XL.MCL untersucht. Die FITC- (530 nm, FL1) und PE- (580 nm, FL2) Fluoreszenzsignale von 10 000 Zellen wurden für die Auswertung herangezogen.



### 4.11.3 Datenanalyse und Statistik

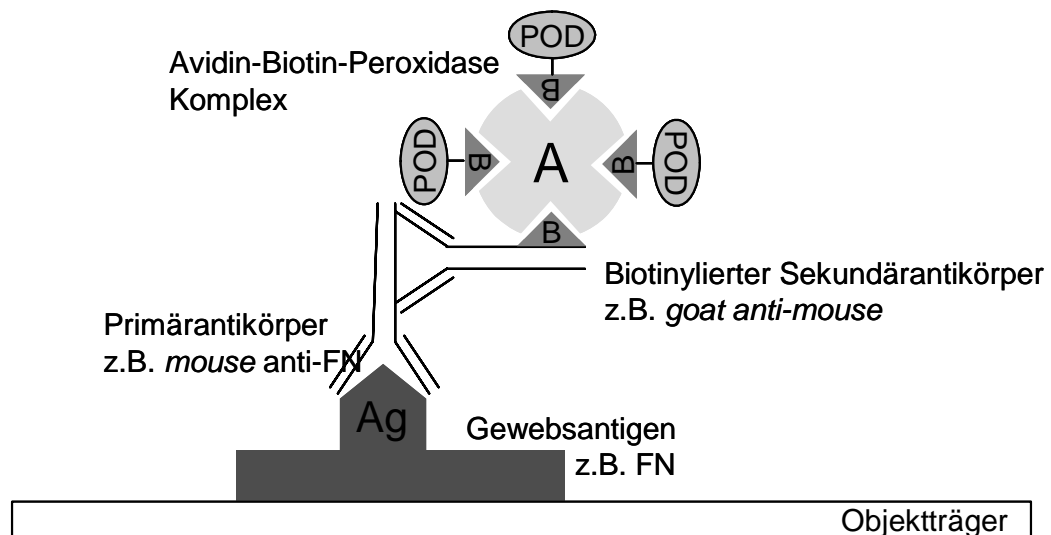
Auf dem *forward scatter* versus *side scatter dot plot* wurde um die intakten Fibroblasten ein Analyse-Gate gesetzt. Innerhalb dieses Bereiches wurden die generierten X-Mean Werte zur Auswertung herangezogen. Dafür wurden die X-mean der Isotyp-Kontrolle von denen der jeweiligen Integrin-Untereinheit abgezogen. Um eine statistische Aussage treffen zu können, wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test angewandt.

## 4.12 Immunhistochemie

### 4.12.1 Allgemeines zur Methode

Die spezifischen FN Spleißformen wurden mit einer indirekter Immunperoxidase Technik untersucht.

Bei dieser von Hsu et al. <sup>194</sup> entwickelten Methode werden an das Zielprotein im Gewebe bindende Primär-Antikörper verwendet, sowie Biotin-konjugierte Sekundär-Antikörper, die den ersten Antikörper erkennen, aber nicht an ein Gewebeprotein binden. Später wird ein vorgefertigter Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) dazu gegeben. Avidin ist ein im Hühnereiweiß enthaltenes Glykoprotein (MG 68 kDa) mit einer sehr hohen Affinität zu dem sehr kleinen Molekül Biotin. Avidin hat vier Bindungsstellen für Biotin und bildet im Experiment eine Brücke zwischen einem biotinylierten Antikörper und einem Peroxidase-assoziierten Biotinmolekül (sogenannte BRAB-Technik <sup>195</sup>). Man entwickelt die Präparate schließlich mit einem Substrat des Enzyms Peroxidase, z.B. mit Vector Nova Red.



**Abbildung 4-3: Modell der Immunhistochemie.** Der Primärantikörper bindet mit seinem Fab- Anteil spezifisch an ein Gewebsantigen. Der biotinylierte Zweitantikörper bindet an das Fc-Fragment des Erstantikörpers. Zusammen mit dem Biotinrest am Fc-Fragment des Sekundärantikörpers kann sich nun ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) ausbilden, der mit Diaminobenzidin zu einem farbigen Produkt reagieren kann. Auf diese Weise kann man Gewebsantigene farbig sichtbar machen. A – Avidin; B – Biotin; Ag – Antigen; POD – Peroxidase

#### 4.12.2 Beschreibung der Technik

Die immunhistochemische Färbung wurde an gefrorenen 5 µm dicken Schnitten intestinaler Mukosa, die auf Glasobjektträgern gebracht wurden, durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden in eiskaltem Aceton (100%) für 10 min fixiert und anschließend getrocknet. Durch eine 30 minütige Behandlung mit 3 % Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) wurde die in der Mukosa befindliche endogene Peroxidase Aktivität inaktiviert werden. Reste von  $H_2O_2$  wurden mit 1xPBS entfernt und unspezifische Bindungen für 30 min mit 10% FCS in PBS blockiert. Nach erneutem Waschen der Schnitte in PBS wurden sie mit dem primären Antikörper in der Blockierlösung in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Alle FN Isoformen wurden mit dem Maus anti-FN (0.5 µg/ml; 35041A, Pharmingen, Hamburg) detektiert. Für den Nachweis von ED-A positiven FN wurden der Antikörper IST-9 (5 µg/ml;

ab6328, Abcam, Cambridge, Großbritannien) verwendet, für FN, die die ED-B Domäne enthielten, PhiloMab-2 (4,6 µg/ml; ANG 202, Philogen, Genua, Italien). Als Isotyp-Kontrolle diente ein Maus anti-IgG1 kappa (5 µg/ml; MOPC-21, Sigma). Nach 1 h wurde der Primärantikörper entfernt und der Biotin konjugierte Sekundärantikörper für 30 min hinzugegeben. Die Färbung wurde dann durch Inkubation mit dem Vectastain® ABC Kit für 30 min verstärkt und anschließend mit Vector® NovaRed™ sichtbar gemacht. Im Anschluss wurden die Zellen mit Hämatoxylin gefärbt. Nach dem Trocknen wurden die Objekte mit Crystal Mount (Biomedica; Forster City, USA) versiegelt.

## 4.13 Western Blotting

### 4.13.1 Probenvorbereitung

Entzündete und nicht entzündete Mukosa von Patienten wurde in kleine Stückchen geschnitten und in 1xRIPA-Puffer mit Proteinase-Inhibitor (1 Tablette auf 10 ml 1x RIPA-Puffer) überführt, mit einem Handbohrgerät homogenisiert und für 30 min auf Eis gelagert und anschließend zentrifugiert (4000 rpm, 5 min bei 4 °C). Fibroblasten wurden direkt für 30 min mit dem RIPA-Puffer inkubiert, dann vom Boden der Zellkulturflasche mit einem *Cellscraper* abgelöst und ebenfalls sedimentiert. Die Konzentration der im Überstand befindlichen Proteinfraction wurde mit dem BCA-Test ermittelt. 30 µg Gesamtprotein einer Probe wurde 1:1 mit Proteinladepuffer, welcher β-ME enthielt, in einem Endvolumen von 20 µl vermischt und für 5-10 min bei 99°C aufgekocht. Nach einer Zentrifugation bei 13000rpm für 1 min, um das Kondenswasser zu sedimentieren, konnten die Proteine auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen werden.

### 4.13.2 Proteinbestimmung (BCA-Protein Assay)

#### 4.13.2.1 Allgemeines zur Methode

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt nach Smith *et al.*<sup>196</sup> mit dem BCA (*bicinchoninic acid*) Reagenz. Das Reaktionsschema kombiniert die Biuret-Reaktion (Protein und  $\text{Cu}^{2+}$  in alkalischer Lösung führt zur Bildung von  $\text{Cu}^{1+}$ ) mit dem wasserlöslichen Natriumsalz der Bicinchoninsäure, einem sehr spezifischen Nachweisreagenz für  $\text{Cu}^{1+}$ . Durch die Interaktion von zwei BCA-Molekülen mit einem  $\text{Cu}^{1+}$ -Ion entsteht ein wasserlösliches, violettes Reaktionsprodukt mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Dies erlaubt die photometrische Quantifizierung von Proteinen in wässriger Lösung.

Im Labor wird die Proteinbestimmung in Mikrotiterplatten nach Lane *et al.*<sup>197</sup> durchgeführt. Diese Methode erfordert nur geringe Probenmengen und die photometrische Auswertung kann mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät durchgeführt werden.

#### 4.13.2.2 Beschreibung der Technik

Zur Quantifizierung der Proteinmengen wurden zunächst für eine Standard-Eichgerade definierte Proteinlösungen hergestellt. In 1x RIPA-Puffer wurden aufsteigend Mengen (0; 200; 400; 600; 800; 1000; 1200 und 2000  $\mu\text{g/ml}$ ) an Rinderserumalbumin (BSA) gelöst und in einer Doppelbestimmung jeweils 10  $\mu\text{l}$  auf eine 96-Well Platte überführt. Von den zu messenden Proben wurden im Anschluss ebenfalls 2x10  $\mu\text{l}$  Probe auf dieselbe 96-Well Platte überführt. Allen Proben wurde dann 200  $\mu\text{l}$  des BCA-Reagenz (50 Teile BCA und 1 Teil  $\text{Cu}^{2+}$ -Sulfat) hinzugegeben, geschüttelt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Platte auf RT konnte die Proteinkonzentration mit Hilfe eines Plattenlesegerätes, welches die

gemessenen Probenwerte mit denen der Eichgerade ins Verhältnis setzt, bei 562 nm bestimmt werden (Programm SOFTmax PRO von Molecular Devices, USA).

#### 4.13.3 SDS-PAGE [modifiziert nach Lämmli <sup>198</sup>]

Für SDS-PAGE wurden Minigele (6 cm Trennstrecke) verwendet. Über ein 6% oder 8% Polyacrylamid enthaltenes Trenngel, das zur Auftrennung von großen Proteinen wie FN benötigt wird, wurde ein Sammelgel mit einer Polyacrylamidkonzentration von 5 % gegossen. Zur Herstellung der Gele wurde eine Acrylamidstammlösung mit 30 % Acrylamid und 0,8 % Bisacrylamid verwendet. Die Polymerisierung der Gele wurde durch Zugabe von APS (Endkonzentration 0,05 %) und TEMED (Endkonzentration 0,1%) erreicht.

Nach dem Aushärten wurde das Gel in eine Kammer eingesetzt und mit *Running Buffer* gefüllt. In die Taschen des Sammelgels wurden 20 µl Probe pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA pro Minigel.

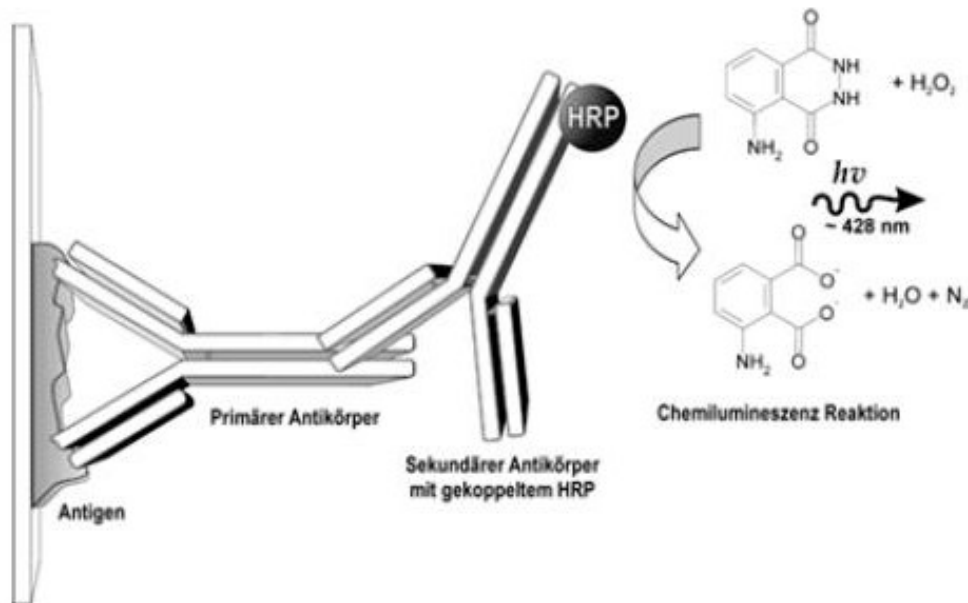
Zusammensetzung der Gele für 2 Minigele (15 ml):

	6%	8%	5% Sammelgel
H <sub>2</sub> O	7,9 ml	6,9 ml	2,7 ml
30% Acrylamid Mix	3,0 ml	4,0 ml	0,67 ml
1,5 M Tris (pH 8.8)	3,8 ml	3,8 ml	0,5 ml
10% SDS	0,15 ml	0,15 ml	0,04 ml
10% APS	0,15 ml	0,15 ml	0,04 ml
TEMED	0,012 ml	0,009 ml	0,004 ml

#### 4.13.4 Western Blot

Nach erfolgter Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde das Proteingel kurz in Transferpuffer geschwenkt und auf eine zuvor ebenfalls mit Transferpuffer benetzte Nitrozellulosemembran gelegt, die auf zwei mit Transferpuffer getränkten Schwämmen und einem dünnen Filterpapier platziert war. Auf das Gel kamen wiederum Filterpapier und Schwämme zum Liegen. Dieser Stapel wurde in ein Xcell II Blot Modul (Invitrogen) gelegt und ein Transfer mit 1 - 2 mA pro cm<sup>2</sup> des Filterpapiers für 1,5 h durchgeführt.

Der Nachweis der transferierten Proteine erfolgte durch Inkubation mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen FN und seine Spleißvarianten. Vor der Antikörperinkubation wurde die Membran für 30 min mit Blockierlösung (5 % Magermilchpulver in Waschpuffer) abgesättigt. Die Antikörperinkubation erfolgte mit der für die Antikörper optimalen Konzentration in 5 % Blockierlösung (FN (1:1000); FN ED-A (1:400); FN ED-B (1:200); FAK (1:1000);  $\beta$ -Aktin (1:1000)) oder in 1% BSA-Waschpuffer (Phospho-FAK (1:1000) üN. Die ungebundenen Antikörper wurden am nächsten Tag durch sechs Waschschrte von jeweils 10 min mit Waschpuffer (0,1% Tween 20 in PBS) entfernt. Danach erfolgte eine weitere Inkubation mit dem HRP (*horseradish peroxidase*) -konjugiertem anti-Maus Sekundärantikörper in 5 % Wasch-Milch. Bei diesem Enzym-Antikörper-Konjugat wird durch das Enzym eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert (Abbildung 4-4). HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol (bzw. je nach Hersteller dessen Derivate) in seine oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz detektiert werden kann.



**Abbildung 4-4: Schematische Darstellung des Western Blot-Prinzips.** Der Primärantikörper bindet spezifisch an das nachzuweisende Protein (Antigen), der wiederum von einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper erkannt und gebunden wird. Bei der durch HRP katalysierten Reaktion kann die freigesetzte Lumineszenz detektiert werden. Quelle: [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)

#### 4.13.5 Stripping

Nach der Exposition konnten die gebundenen Antikörper von der verwendeten Membran mit der *Re-Blot Plus-Strong*-Lösung entfernt werden. Dafür wurde die Membran kurz gewaschen und anschließend für 15 min mit dem Detergenz inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden frei gewordene unspezifische Bindungen wieder in Blockierlösung gesättigt bevor die Membran für eine weitere Antikörperinkubation genutzt werden konnte.

#### 4.13.6 PonceauS Färbung

Da SDS-PAGE Gele, auf denen größere Protein nachgewiesen werden sollten, Aktin nicht mehr enthielten, wurde zur Kontrolle, ob für jede zu untersuchende Probe gleich viel Gesamtprotein aufgetragen wurde eine PonceauS Färbung durchgeführt.

Dafür wurde die Membran in Waschpuffer gewaschen und in der Färbelösung bis zur vollständigen Rotfärbung (ca. 10 min) inkubiert. Danach wurde überschüssige Farbe durch erneutes Waschen entfernt. Zum Schluss waren nur noch die Proteinbanden auf der Membran gefärbt.



## 5. Ergebnisse

### 5.1 FN und Integrin $\alpha 5\beta 1$ bei CED

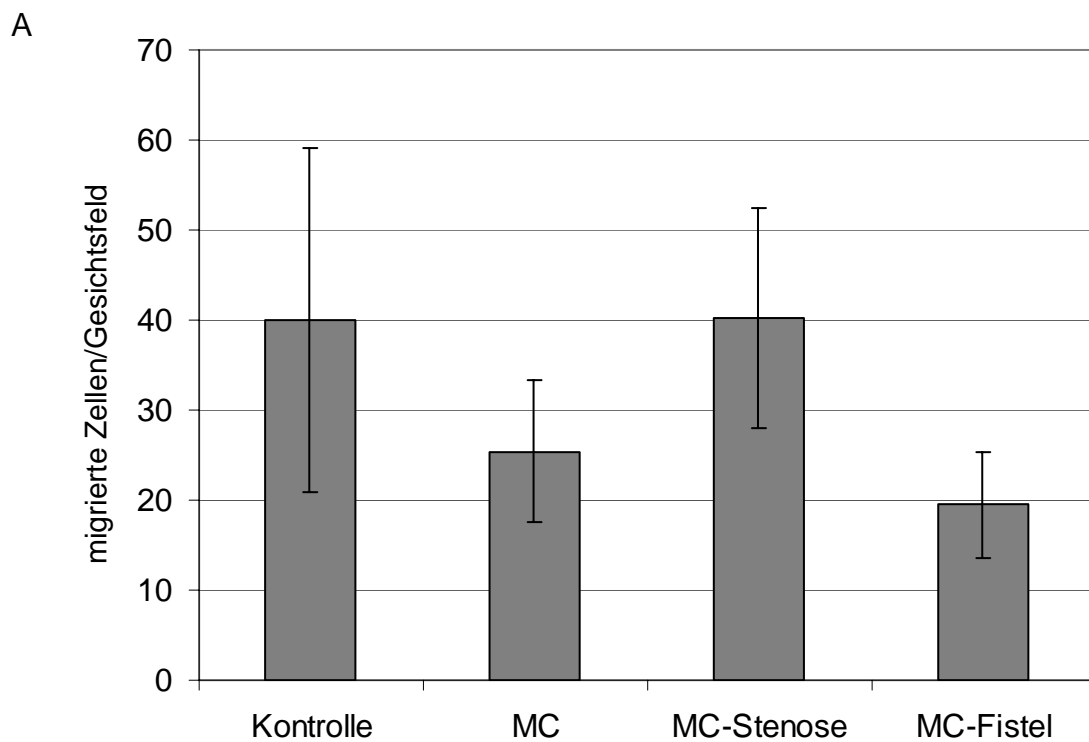
#### 5.1.1 Migrationsverhalten der aus Stenosearealen isolierten MC-CLPF

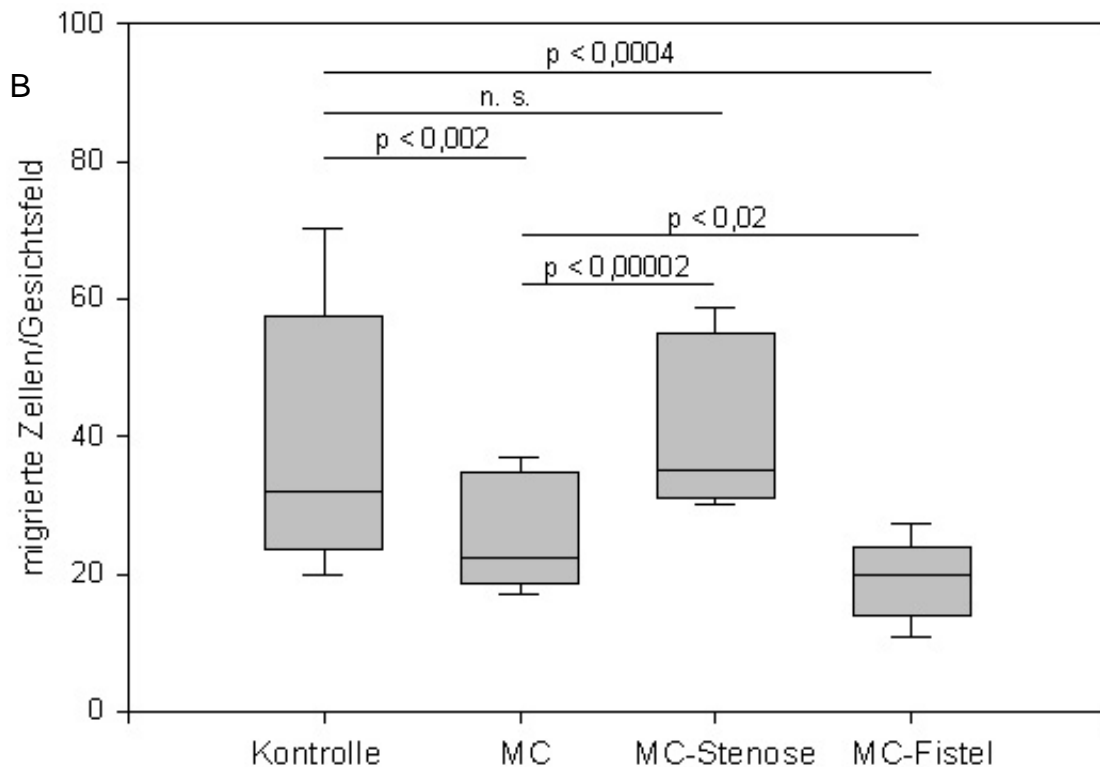
Basierend auf den Erkenntnissen des subtraktiven Screenings mit cDNA von MC-Stenose- und Kontroll-CLPF sowie der beobachteten Migrationsunterschiede zwischen den einzelnen CLPF-Kulturen von Patienten mit und ohne CED, wurden zunächst Migrationsversuche durchgeführt. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden zwar Migrationsunterschiede zwischen Kontroll- und MC-CLPF bzw. zwischen MC-CLPF, die aus Stenosearealen, aus einfach entzündeter Mukosa oder aus Fistelgewebe isoliert wurden, untersucht, jedoch wurden nie die gut migrierenden Kontroll- und Stenose-CLPF miteinander verglichen. Da der identifizierte Migrationsinduktor FN durch die subtraktiven Hybridisierungen in fibrotischem MC-Gewebe als vermehrt exprimiert nachgewiesen wurde, lag die Vermutung nahe, dass CLPF, die aus stenotischem Gewebe von Patienten mit MC gewonnen wurden, mehr oder ähnlich stark migrieren wie CLPF aus gesundem Kontrollgewebe.

Für die Untersuchung wurden 3 unabhängige Migrationsassays mit Kontroll-, MC-, MC-Stenose- und MC-Fistel in der modifizierten Boyden Kammer durchgeführt. Die gegen FN durch die Membran gewanderten CLPF wurden unter dem Durchlichtmikroskop bei 400 facher Vergrößerung gezählt und die Ergebnisse graphisch dargestellt (Abbildung 5-1A).

Wie bereits gezeigt wurde <sup>191</sup>, wanderten CLPF aus Fisteln ( $19 \pm 6$  Zellen) signifikant (Student's t-Test,  $p < 0,02$ ) weniger als CLPF aus einfach entzündeter Mukosa von MC-Patienten ( $25 \pm 8$  Zellen), während CLPF aus Stenosearealen stärker migrierten ( $40 \pm 12$  Zellen;  $p < 0,00002$ ). MC-CLPF zeigten ein signifikant geringeres

Migrationspotential ( $p < 0,02$ ) als Kontroll-CLPF ( $40 \pm 19$  Zellen)<sup>128</sup>. Verglichen mit der Zahl der migrierten MC-CLPF aus stenosierter Mukosa wanderten Kontroll-CLPF im Durchschnitt gleich stark. Das Migrationsverhalten der Kontroll-CLPF schwankte jedoch stärker als das der CLPF aus Stenosegewebe von MC-Patienten (Abbildung 5-1B).





**Abbildung 5-1: Migration von Kontroll-CLPF und CLPF, die aus der einfach entzündeten, stenosierenden oder fistulierenden Mukosa von MC-Patienten isoliert wurden.** Die Migration wurde mit serumfreien Medium und 25 µg/ml FN induziert. Die Anzahl der migrierten CLPF ist als durchschnittliche Migrationsrate (A) und als Gesamtmigrationsrate (B) grafisch dargestellt.

Im Vergleich zu Kontroll-CLPF wanderten Stenose-CLPF von MC-Patienten gleich stark. CLPF, die aus einfach entzündeter Mukosa von Patienten mit MC isoliert wurden, hatten ein geringeres Migrationspotential. CLPF aus Fistelgewebe wanderten dahingegen noch weniger.

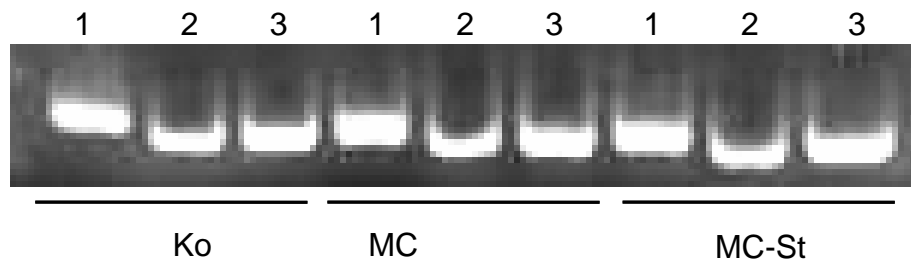
(B) Student's t-Test

Bei den durchgeführten Migrationsversuchen in der modifizierten Boydenkammer konnte das beobachtete verringerte Migrationsverhalten von MC- und Fistel-CLPF <sup>128, 191</sup> bestätigt werden. CLPF, die aus Stenosearealen isoliert wurden, zeigten nicht nur ein höheres Migrationspotential als MC-CLPF <sup>191</sup>, denn sie migrierten im Durchschnitt so wie die untersuchten Kontroll-CLPF.

### 5.1.2 Expression von FN Spleißformen in der Mukosa von Patienten mit CED

Wegen der Erkenntnisse, die bei den subtraktiven Hybridisierungen gewonnen wurden, sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Verteilung von FN und seinen Isoformen in der Mukosa von Patienten mit CED im Vergleich zu gesunder Mukosa untersucht werden.

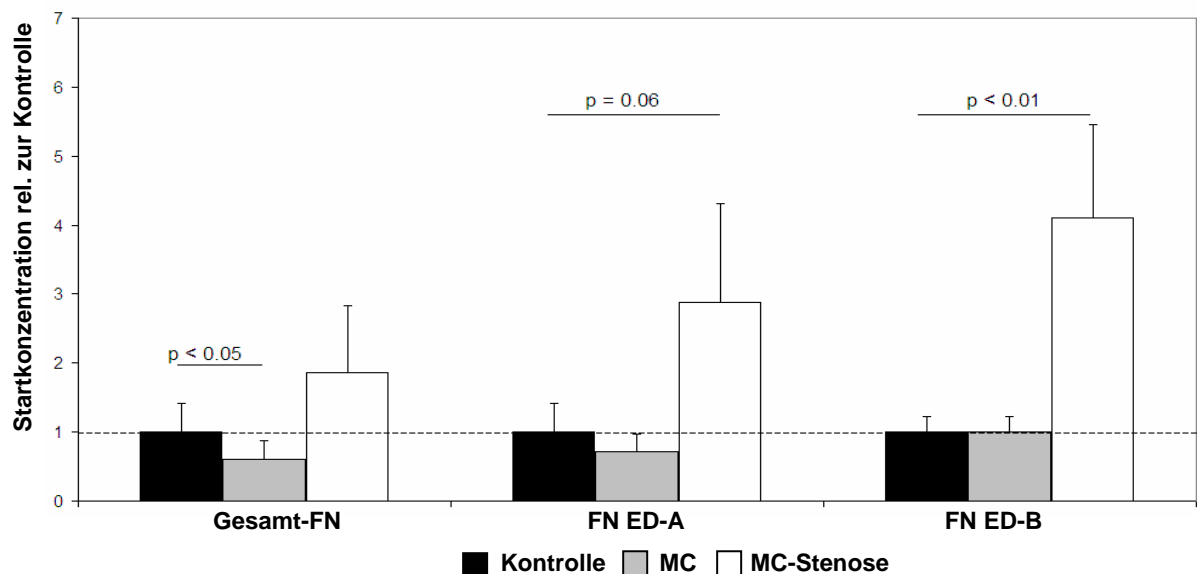
Dafür wurde zuerst Gesamt-RNA aus Biopsien oder aus der Mukosa von Darmpräparaten isoliert. Nach reverser Transkription der RNA wurde die cDNA auf Transkripte von FN ED-A, FN ED-B und IIIcS untersucht (Abbildung 5-2). In entzündeter Mukosa und Stenosearealen von Patienten mit MC sowie in Kontrollmukosa konnten mRNA aller FN Isoformen nachgewiesen werden. Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen waren mit dieser nicht quantitativen Methode nicht zu beobachten.



**Abbildung 5-2: Nachweis der FN Spleißvarianten ED-A, ED-B und IIIcS auf mRNA-Ebene mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).** Aus entzündeter Mukosa und Stenosearealen von MC-Patienten sowie aus Kontrollmukosa wurde Gesamt-RNA isoliert und auf die Expression von FN ED-A- (1), FN ED-B- (2) und IIIcS-mRNA (3) untersucht. Es konnten für alle 3 Gruppen mRNA-Transkripte nachgewiesen werden. Unterschiede in der Expressionsstärke konnten nicht beobachtet werden.

Da durch die qualitative RT-PCR keinerlei Aussage über Unterschiede in der FN- und Isoformenexpression in der Mukosa von Patienten mit und ohne MC getroffen werden konnte, wurde die mRNA auch quantitativ mittels *real-time* PCR untersucht.

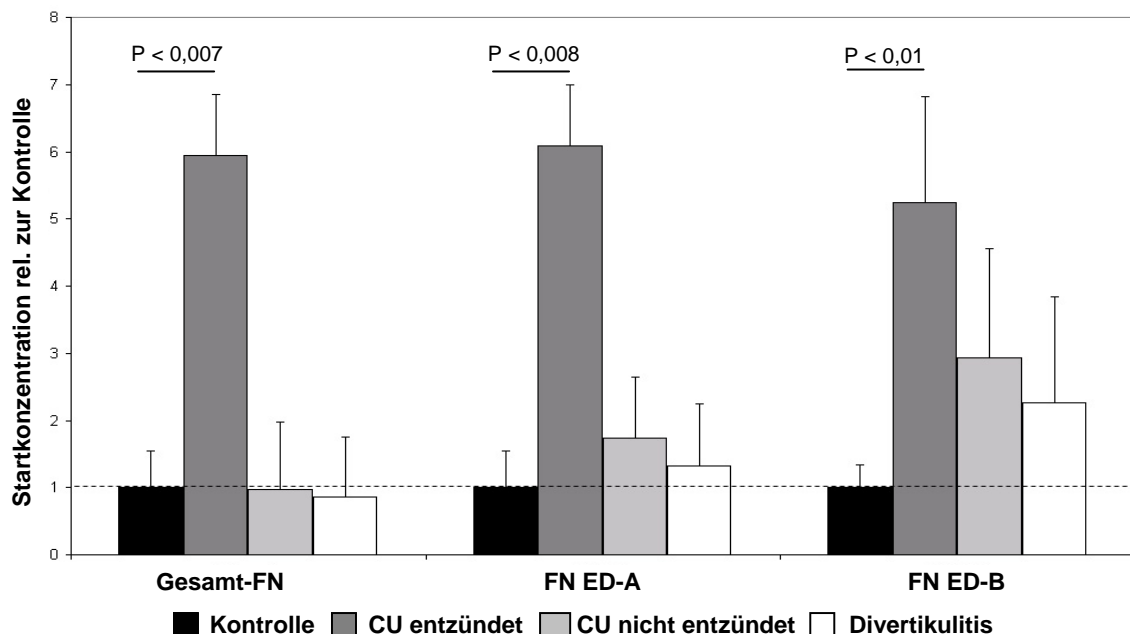
Für 22 Kontrollen, 26 MC-Patienten und 7 Patienten mit fibrotischem MC wurden die Ct-Werte (siehe 4.10.1) FN, FN ED-A, ED-B und GAPDH als *house-keeping gene* ermittelt und daraus die relativen Startkonzentrationen berechnet, wobei die Konzentration der cDNA, die aus der Mukosa von Kontrollpatienten isoliert wurde, gleich 1 gesetzt wurde. Mukosa von Patienten mit stenosierendem MC zeigten eine höhere FN- und FN-Isoformen-Expression im Vergleich zu den anderen Gruppen (Abbildung 5-3A). Verglichen mit der Kontrollgruppe war in Stenosearealen von MC-Patienten die FN-mRNA 1,9 fach, FN ED-A-mRNA 2,9 fach ( $p = 0,06$ ) und FN ED-B-mRNA 4,1 fach erhöht ( $p < 0,01$ ). Im Gegensatz dazu lag in MC-Mukosa die FN-mRNA um 40 % ( $p < 0,05$ ) und die FN ED-A-mRNA um 25 % reduziert vor. FN ED-B-mRNA wurde in ähnlicher Menge zur mRNA von Kontrollpatienten detektiert.



**Abbildung 5-3A: Quantitative mRNA Analyse von FN Spleißvarianten mittels *real-time* PCR.** Die mRNA wurde aus Mukosa von 22 Kontroll-, 26 MC- und 7 MC Stenose-Patienten isoliert. Die cDNA Startkonzentration der Kontrollgruppe wurde 1 gleichgesetzt. Im Gegensatz zu Kontrollpatienten zeigten Patienten mit stenosierendem MC eine höhere und Patienten mit einfach entzündetem MC eine geringere FN- und FN ED-A- und FN ED-B-Expression. Statistik mit dem *Mann-Whitney Rank Sum Test*. Alle angegebenen Fehler sind Standardfehler.

Des Weiteren wurde die Expression der FN-mRNA bei Patienten mit CU und mit Divertikulitis, als eine entzündliche aber nicht CED („Entzündungskontrolle“),

untersucht. Dafür wurde Gesamt-RNA aus Mukosa von Patienten mit leichter und schwerer CU sowie von Patienten mit Divertikulitis isoliert und die FN- bzw. GAPDH-Expression mittels TaqMan-PCR quantitativ gemessen. Die Startkonzentration wurde wieder ermittelt, wobei die der Kontrollgruppe (n=22) erneut gleich 1 gesetzt wurde. Mukosagewebe von Patienten mit schwerer CU zeigten eine signifikant um ca. 6 fach höhere mRNA-Expression an FN ( $p < 0,007$ ), FN ED-A ( $p < 0,008$ ) und eine 5,5 fache stärkere ED-B mRNA-Expression ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 5-3B). Keine signifikanten Expressionsunterschiede konnten in leichter CU bzw. CU in Remission sowie Divertikulitis beobachtet werden. Die mRNA von FN und FN ED-A war in einfach entzündetem Gewebe von CU-Patienten und Patienten mit Divertikulitis exprimiert. Die Expression der FN ED-B mRNA stieg in der Mukosa von Patienten mit CU und Divertikulitis im Gegensatz zu der Mukosa von Kontrollpatienten leicht an. Diese Unterschiede erreichten jedoch keine Signifikanz.



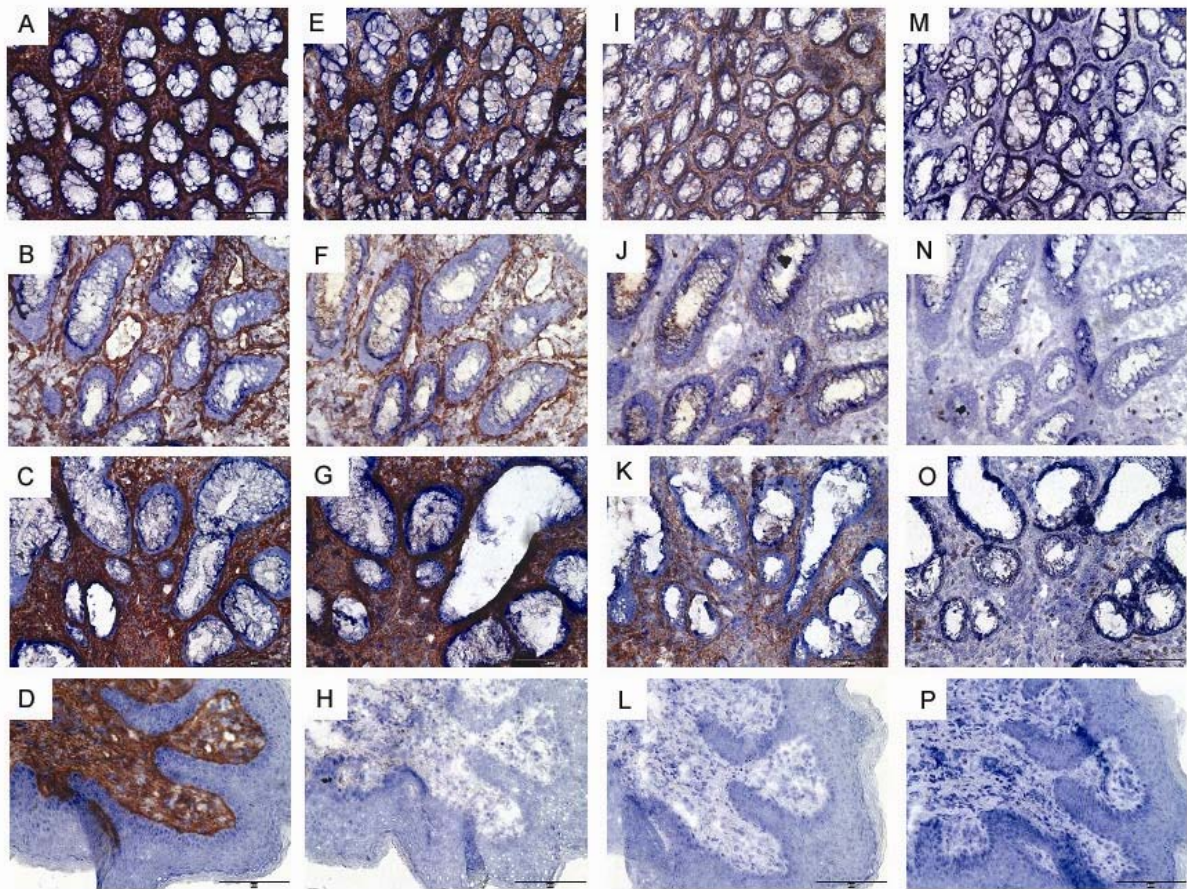
**Abbildung 5-3B: Quantitative mRNA Analyse von FN Spleißvarianten bei CU- und Divertikulitis-Patienten.** Die mRNA wurde aus Mukosa von 3 Patienten mit schwerer CU, 4 Patienten mit leichter CU und 3 Divertikulitis-Patienten isoliert. Die cDNA Startkonzentration der Kontrollgruppe (n=22) wurde 1 gleichgesetzt. Im Gegensatz zu Kontrollpatienten zeigten Patienten mit stark entzündeter CU

eine höhere FN- und FN ED-A- und FN ED-B-Expression, während Patienten mit nicht entzündeter CU oder Divertikulitis keine Unterschiede in der mRNA-Expression zeigten. Statistik mit dem *Mann-Whitney Rank Sum Test*. Alle angegebenen Fehler sind Standardfehler.

Um eine Aussage hinsichtlich der Verteilung und der Stärke der Proteinexpression treffen zu können, wurden immunhistochemische Färbungen gegen FN durchgeführt. An 5 µm Kryoschnitten humaner intestinaler Mukosa von Kontrollpatienten und Patienten mit MC, stenosierendem oder fistulierendem MC wurde die Verteilung an FN sowie ED-A und ED-B enthaltendes FN untersucht (Abbildung 5-4). Dafür wurden die monoklonalen Antikörper anti-FN, der alle FNe erkennt, IST-9, welcher spezifisch für FN ED-A ist, und PhiloMab-2, der an die ED-B Domäne bindet, verwendet. Alle FN Isoformen wurden mit Vector® NovaRed™ visualisiert. Um die Zellen sichtbar zu machen, wurden die Gewebeschnitte mit Hämatoxilin behandelt.

FN konnte in den Geweben aller untersuchten Patienten nachgewiesen werden (Abbildung 5-4A-D). Im Vergleich zur Kontrollmukosa (Abbildung 5-4A) erschien Gesamt-FN in Fisteln (Abbildung 5-4D) ähnlich stark, in entzündeter Mukosa bei Patienten mit MC (Abbildung 5-4B) vermindert und in Stenosen (Abbildung 5-4C) erhöht exprimiert. Die Färbung der Isoformen ED-A und ED-B wies vergleichbare Ergebnisse auf. In entzündeter MC-Mukosa (Abbildung 5-4F+J) waren ED-A und ED-B im Gegensatz zum Intestinum von Kontrollpatienten (Abbildung 5-4E+I) erniedrigt. Dagegen fand man die Spleißformen in fibrotischem MC-Gewebe vermehrt (Abbildung 5-4G+K). Interessanterweise konnten die Spleißformen in Fistelgewebe nicht sichtbar gemacht werden (Abbildung 5-4H+L). Diese Beobachtungen ließen darauf schließen, dass sowohl FN als auch die Spleißformen ED-A und ED-B in entzündeter Mukosa vermindert und in stenosierenden Arealen von MC-Patienten vermehrt im Vergleich zu Kontrollpatienten vorliegen.

Eine unspezifische Bindung der verwendeten Antikörper konnte ausgeschlossen werden, da die Isotyp-Kontrollen keine Färbungen aufwiesen (Abbildung 5-4M-P)



**Abbildung 5-4: Immunhistochemische Färbung von FN, FN ED-A und ED-B in Kontrollmukosa und entzündeter Mukosa von MC Patienten.** Gefrorenes humanes Gewebe wurde für Immunperoxidase-Färbungen geschnitten und in Aceton fixiert. Die obere Reihe zeigt normale nicht entzündete Mukosa von Kontroll-Patienten. Entzündete, stenosierende und fistulierende Mukosa von MC-Patienten sind in den Reihen darunter gezeigt. Alle Gewebe wurden mit Antikörper gegen Gesamt-FN (links), FN ED-A (2. von links) und FN ED-B (3. von links) gefärbt. Isotyp-Kontrollen sind in der rechten Spalte dargestellt. Im Gegensatz zu Kontrollgewebe wurden FN und die FN Spleißformen in Stenosearealen erhöht und in einfach entzündeter Mukosa von Patienten mit MC vermindert gefunden. In Fistelgewebe war die FN-Proteinexpression ähnlich der in Kontrollmukosa, während die Spleißvarianten nicht sichtbar gemacht werden konnten.

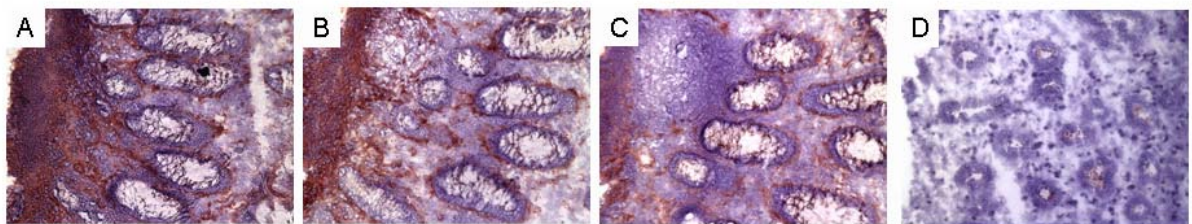
Diese Abbildung zeigt eine repräsentative Färbung von insgesamt 7 unabhängigen Experimenten.

Hinsichtlich der FN Proteinexpression wurde auch Gewebe von Patienten mit schwerer CU und Divertikulitis untersucht. Im Vergleich zu Kontrollgewebe (Abbildung 5-4 A+E+I) konnte in der Mukosa von Patienten mit schwerer CU eine

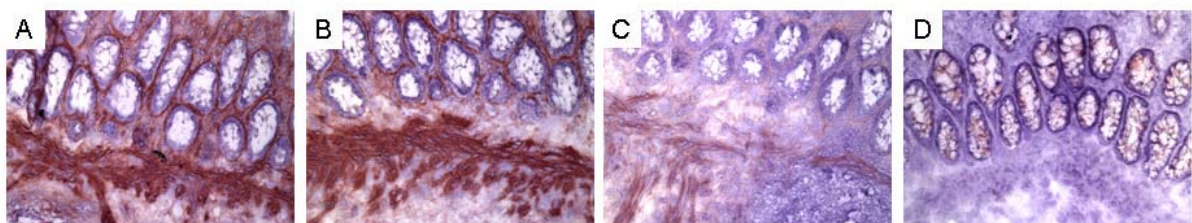


erhöhte Färbung an FN (Abbildung 5-5A) und den FN Isoformen ED-A (Abbildung 5-5B) und ED-B (Abbildung 5-5C) beobachtet werden. Die FN-, FN ED-A- und FN ED-B-Proteinfärbung in Gewebe von Divertikulitis-Patienten (Abbildung 5-6A-C) hingegen erschien im Vergleich zu der von Kontrollpatienten (Abbildung 5-4A+E+I) ähnlich stark. Vor allem die FN Spleißform ED-B (Abbildung 5-6C) war nur sehr schwach nachzuweisen.

Die in den immunhistochemischen Untersuchungen mitgeführten Isotypkontrollen (Abbildung 5-5D und 5-6D) zeigten keine Färbung, so dass eine unspezifische Markierung durch die verwendeten Antikörper ausgeschlossen werden konnte.

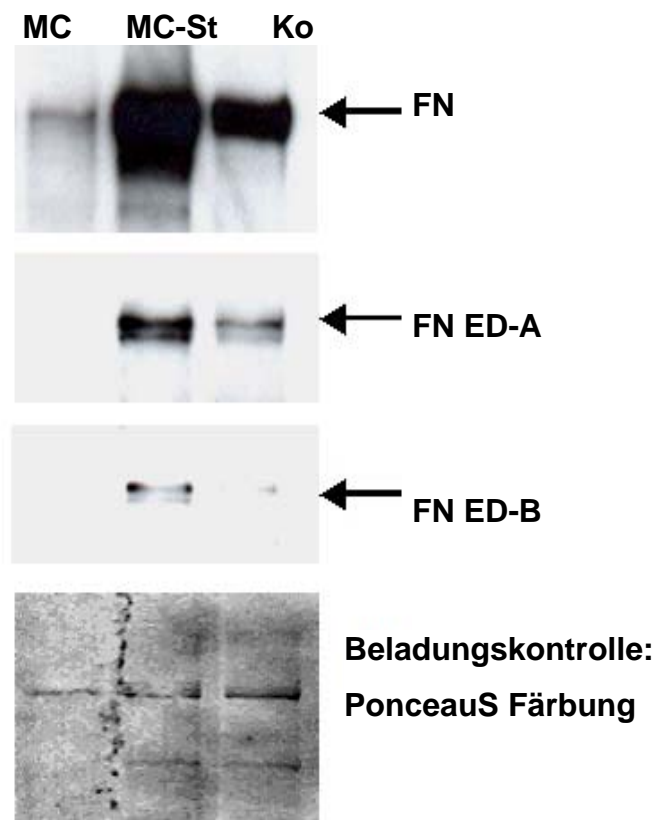


**Abbildung 5-5: Immunhistochemische Färbung von FN, FN ED-A und ED-B in stark entzündeter Mukosa von CU Patienten.** Gefrorenes humanes Gewebe wurde für Immunperoxidase-Färbungen geschnitten und in Aceton fixiert. Die Mukosa wurde gegen Gesamt-FN (A), FN ED-A (B) und FN ED-B (C) gefärbt. FN und die FN Spleißvarianten waren erhöht in der stark entzündeten Mukosa von CU Patienten nachweisbar. Die Isotyp Kontrolle (D) zeigte keine Färbung.



**Abbildung 5-6: Immunhistochemische Färbung von FN, FN ED-A und ED-B in Divertikulitis.** Gefrorenes humanes Gewebe wurde für Immunperoxidase-Färbungen geschnitten und in Aceton fixiert. Die Mukosa wurde gegen Gesamt-FN (A), ED-A positive (B) und ED-B positive FN (C) gefärbt und zeigte eine ähnliche Expression wie in Kontrollgewebe (siehe Abb. 5-4). Die Isotyp Kontrolle (D) zeigte keine Färbung.

Um die bei der Immunhistochemie beobachteten unterschiedlichen Proteinmengen an FN, FN ED-A und ED-B in der intestinalen Mukosa von Kontroll- und MC-Patienten zu bestätigen, wurden Mukosalysate im Western Blot untersucht. Je 30 µg Gesamt-Protein des jeweiligen zu untersuchenden Mukosalysates wurde in einem 6 % igen Gel mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde das Proteingel auf eine Membran geblottet und diese mit den jeweiligen Antikörpern, die die nachzuweisende Isoform erkannten, inkubiert. Die exponierten Filme (Abbildung 5-7) zeigten vergleichbare Ergebnisse zu den immunhistochemischen Färbungen. In Stenoseareal-Lysaten von Patienten mit MC konnten höhere Proteinmengen an FN und den FN Isoformen detektiert werden. Die FN-Spleißvariante ED-B war im Gegensatz zu Kontrolllysaten deutlich nachweisbar. Dahingegen war in den Mukosalysaten von MC-Patienten FN ED-B sowie ED-A nicht mehr detektierbar. Auch war die Gesamt-Menge an FN-Protein in diesen Lysaten niedriger als in denen von Kontrollpatienten. Zudem konnten für FN ED-A und FN ED-B Doppelbanden beobachtet werden, die auf ein vom Molekulargewicht kleineres FN aufgrund von alternativem Spleißen schließen ließen. Die PonceauS Färbung zeigte, dass die verschiedenen Lysate gleiche Gesamtproteinmengen enthielten.



**Abbildung 5-7: Ein repräsentativer Western blot von FN, FN-ED-A und FN-ED-B Proteinen in Mukosalysaten von Kontrollpatienten (Ko) und Patienten mit MC und MC-Stenose (MC-St).** Die Proteine wurden mittels eines 6% SDS-PAGE Gels aufgetrennt und durch Western blotting mit Hilfe von Antikörpern gegen FN visualisiert. In Lysaten, die aus Stenosearealen von Patienten mit MC gewonnen wurden, zeigte sich eine höhere und in MC-Mukosalysaten eine stark erniedrigte FN- und FN Spleißformen-Proteinexpression als in Kontrolllysaten. Die gleiche Proteinbeladung auf dem Gel konnte mit einer PonceauS Färbung gezeigt werden. Diese Abbildung ist repräsentativ für 4 weitere Experimente.

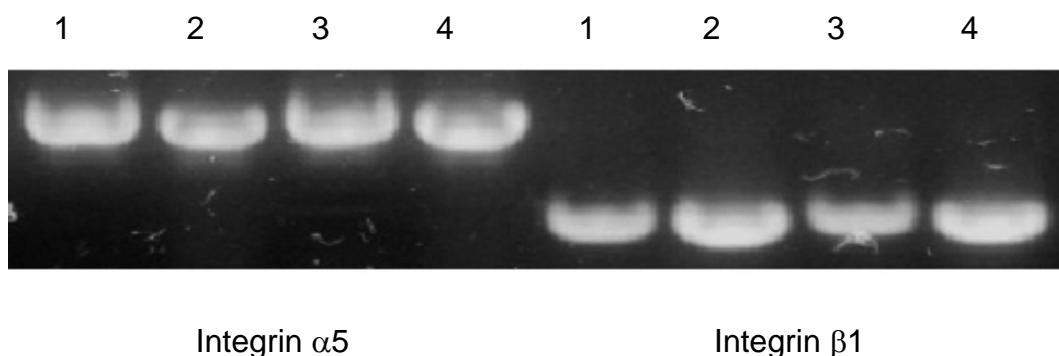
Es konnten deutliche Unterschiede in der Expression von FN und den FN Spleißformen ED-A und ED-B in der Mukosa von Kontroll- und CED-Patienten beobachtet werden. In der Mukosa von Patienten mit MC zeigte sich eine Reduktion von FN, FN ED-A und FN ED-B auf mRNA- und Proteinebene im Vergleich zu gesunder Mukosa von Kontrollpatienten. Die mRNA- und Proteinexpression von FN und den FN Isoformen war in Stenosearealen von MC-Patienten dahingegen erhöht. In MC-Fistelgewebe konnte durch Immunhistochemie kein FN ED-A- und FN ED-B-Protein nachgewiesen werden. Bei Patienten mit einer Divertikulitis oder einer

leichten CU konnte keine mRNA- und Proteinexpressionsveränderung von FN und den Isoformen beobachtet werden. Dahingegen wiesen Patienten, die eine schwere CU entwickelten, anders als Patienten mit einer MC-Erkrankung eine Erhöhung der FN-Expression auf mRNA- und Proteinebene auf.

### 5.1.3 Unveränderte Integrin $\alpha 5 \beta 1$ Expression bei Kontroll- und MC-CLPF

Untersucht werden sollte nun, ob die veränderte Expression an FN und den FN Spleißformen sowie die beobachteten veränderte Fibroblastenmigration mit einer unterschiedlichen FN-Rezeptorexpression einherging. Dafür wurde die Oberflächenexpression des FN-Rezeptor Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  auf CLPF untersucht, die aus der Mukosa von Kontroll- und MC-Patienten isoliert wurden.

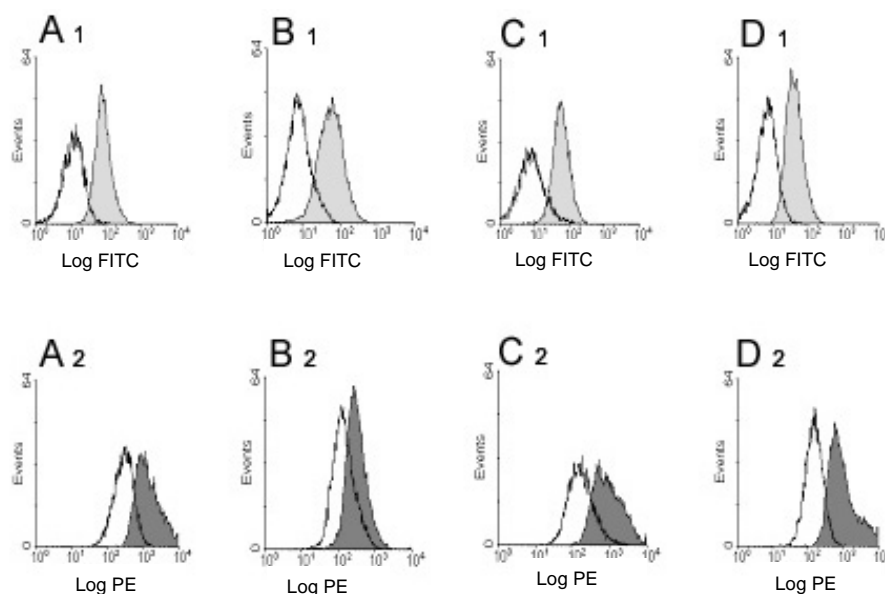
Zuerst wurde das Vorhandensein der Integrin  $\alpha 5 \beta 1$ -mRNA per RT-PCR überprüft (Abbildung 5-8). PCR Produkte, die den Integrin Untereinheiten  $\alpha 5$  und  $\beta 1$  entsprachen, konnten in allen CLPF-Lysaten detektiert werden ( $n = 3$ ). In dieser semiquantitativen Analyse konnten keine Unterschiede zwischen Kontroll- und MC-Fibroblastenkulturen beobachtet werden.



**Abbildung 5-8: Nachweis der Integrin Untereinheit  $\alpha 5$  und  $\beta 1$  auf mRNA-Ebene mittels PCR.**

Aus Kontrollmukosa (1) sowie entzündeter Mukosa (2), Stenosearealen (3) und Fistelgewebe (4) von MC-Patienten wurde Gesamt-RNA isoliert und auf die Expression von Integrin  $\alpha 5$  und  $\beta 1$  untersucht. In allen Geweben konnten Transkripte der Integrin Untereinheit  $\alpha 5$  und  $\beta 1$  nachgewiesen werden. Unterschiede wurden nicht beobachtet.

Nachdem die Präsenz der Integrin-mRNA nachgewiesen werden konnte, wurde die Zelloberflächenpräsentation von Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  mittels FACS analysiert. Aus intestinaler Mukosa von Kontroll- und MC-Patienten isolierte CLPF wurden mit FITC- und PE-konjugierten Antikörpern gegen die Integrin Untereinheit  $\alpha 5$  und  $\beta 1$  gefärbt. Abbildung 5-9A zeigt Histogramme für die untersuchten CLPF-Kulturen, in denen die detektierte Fluoreszenz der untersuchten Integrin-Untereinheit und der dazugehörigen Isotyp-Kontrolle logarithmisch zur Zellzahl dargestellt ist. Die Fluoreszenz der Integrin  $\alpha 5$ - (hellgraues Histogramm) bzw.  $\beta 1$ - (dunkelgraues Histogramm) positiven Zellen ist im Histogramm im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle (weißes Histogramm) nach rechts verschoben. Es wurde eine Expression beider Integrin-Untereinheiten auf allen Fibroblastenzelloberflächen detektiert (Abbildung 5-9A).

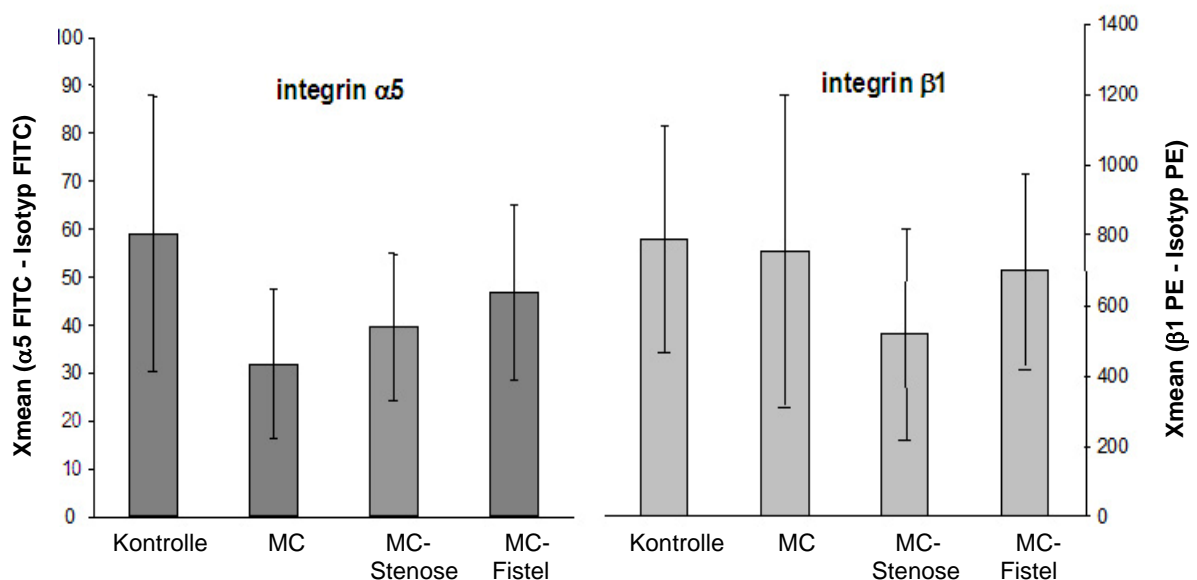


**Abbildung 5-9A: Darstellung repräsentativer Ergebnisse der FACS-Analyse der Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  Expression auf humanen CLPF von Kontrollpatienten und Patienten mit MC als Histogramm.**

Die Zellen wurden gefärbt mit FITC-gebundenem anti-integrin  $\alpha 5$  (hellgraues Histogramm), PE-gebundenen anti-integrin  $\beta 1$  (dunkelgraues Histogramm) und FITC- bzw. PE-gebundenem Kontroll-Antikörpern (weißes Histogramm). Die Integrin  $\alpha 5$  (1) und  $\beta 1$  Proteinexpression (2) konnte auf der Oberfläche von Kontroll-CLPF (A), von Patienten mit MC (B), von Patienten mit MC-Stenose (C) und von Patienten mit fistulierendem MC (D) detektiert werden. Unterschiede zeigten sich nicht.

Abzisse: logarithmische Auftragung der Fluoreszenzintensität; Ordinate: lineare Auftragung der Anzahl detektierter fluoreszierender Zellen

Um eine konkretere Aussage bezüglich der Integrin  $\alpha 5 \beta 1$ -Expression treffen zu können, wurden die mittleren Fluoreszenzsignale (Mean X-Werte) der detektierten FITC- und PE-Farbstoffe auf der Zelloberfläche der CLPF analysiert. Die Mean X-Werte der entsprechenden Isotypkontrollen wurden von den CLPF isoliert aus Kontrollmukosa, aus entzündeter Mukosa, Stenosearealen und Fistelgewebe von MC-Patienten abgezogen. Signifikante Unterschiede konnten dabei weder für die Integrin Untereinheit  $\alpha 5$  noch für  $\beta 1$  nachgewiesen werden (Abbildung 5-9B).



**Abbildung 5-9B: Graphische Darstellung der FACS-Analyse der Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  Expression in humanen CLPF von Kontrollpatienten und Patienten mit MC.** Signifikante Unterschiede der Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  Expression wurden in den untersuchten CLPF-Kulturen nicht gefunden. FACS-Analysen wurden drei Mal an 9 Kontroll-, 3 MC-, 4 MC-Stenose- und 7 MC-Fistel-CLPF Kulturen durchgeführt.

Während sich in der Mukosa von Patienten mit MC im Gegensatz zu Kontrollmukosa eine erniedrigte Expression an FN und seinen Spleißformen zeigte und in Stenosearealen von MC-Patienten mehr FN exprimiert wurde, war die Integrinexpression bei den untersuchten CLPF-Kulturen, die aus Kontrollmukosa und

aus einfach entzündeter, stenosierter oder fistulierender Mukosa von MC-Patienten isoliert wurden, unverändert.

## 5.2 Stimulation von Kontroll-CLPF mit IFN- $\gamma$ , TNF und TGF- $\beta$ 1

Die Zytokine TNF und IFN- $\gamma$  werden während der Wundheilung oder auch im Entzündungsprozess sezerniert. In der intestinalen Mukosa von Patienten mit MC und CU wird TNF in großen Mengen von aktivierten Makrophagen gebildet<sup>117-121</sup>. IFN- $\gamma$  scheint hauptsächlich bei einer MC-Erkrankung erhöht exprimiert zu sein<sup>117, 122</sup>. Interferone gelten in erster Linie als Inhibitoren der Zellbewegung<sup>123</sup>. Die Isoformen IFN- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  inhibieren die Migration von Hautfibroblasten dosisabhängig<sup>124</sup>. Über den Einfluss von TNF auf die Migration von Fibroblasten gibt es unterschiedliche Erkenntnisse. Bei Hautfibroblasten induziert TNF keine Migration<sup>125</sup>. Es fungiert bei diesen Zellen eher als Migrationsaktivator<sup>126</sup>, da durch TNF-Vorinkubation das Einwandern in ein Kollagen I Gel verstärkt werden kann<sup>125</sup>. Der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  stimuliert mesenchymale Zellen zur Proliferation und zur Produktion von extrazellulärer Matrix und ist somit ein wichtiger Vermittler in vielen fibrotischen Krankheiten wie stenosierendem MC<sup>101</sup>. Außerdem ist er ein potentes Chemoattraktant für humane Hautfibroblasten zur Stimulation der Fibroblastenmigration<sup>100</sup>. TGF- $\beta$  bewirkt eine Expressionserhöhung von  *$\alpha$ -smooth muscle actin* und Stressfaserformation in Fibroblasten und damit die Differenzierung in Myofibroblasten<sup>96</sup>.

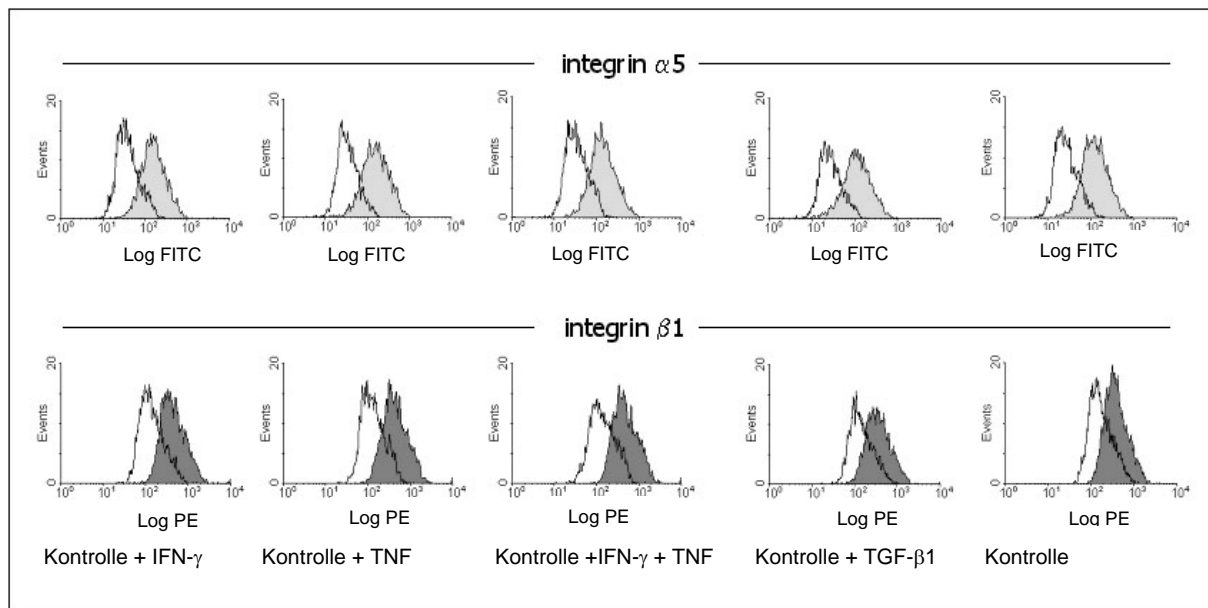
Wie bereits erwähnt, zeigten verschiedene Konzentrationen von IFN- $\gamma$  oder TNF im konditionierten Medium eine dosisabhängige Reduktion der Migration von CLPF, die aus der gesunden Mukosa von Patienten isoliert wurden. Für 3 Tage mit IFN- $\gamma$  und/oder TNF im konditionierten Medium vorinkubierte Kontroll-CLPF zeigen ein signifikant geringeres Migrationspotential als unbehandelte Zellen. Selbst nach 7 Tagen zeigen diese vorbehandelten Kontroll-CLPF ohne weitere Zugabe von Zytokinen im konditionierten Medium eine signifikant reduzierte Migration<sup>128</sup>. Es



stellte sich nun die Frage, ob die durch Inkubation mit IFN- $\gamma$ , TNF reduzierte bzw. durch TGF- $\beta$  gesteigerte CLPF-Migration mit einer entsprechenden Expression von FN und den FN Spleißvarianten korrelierte.

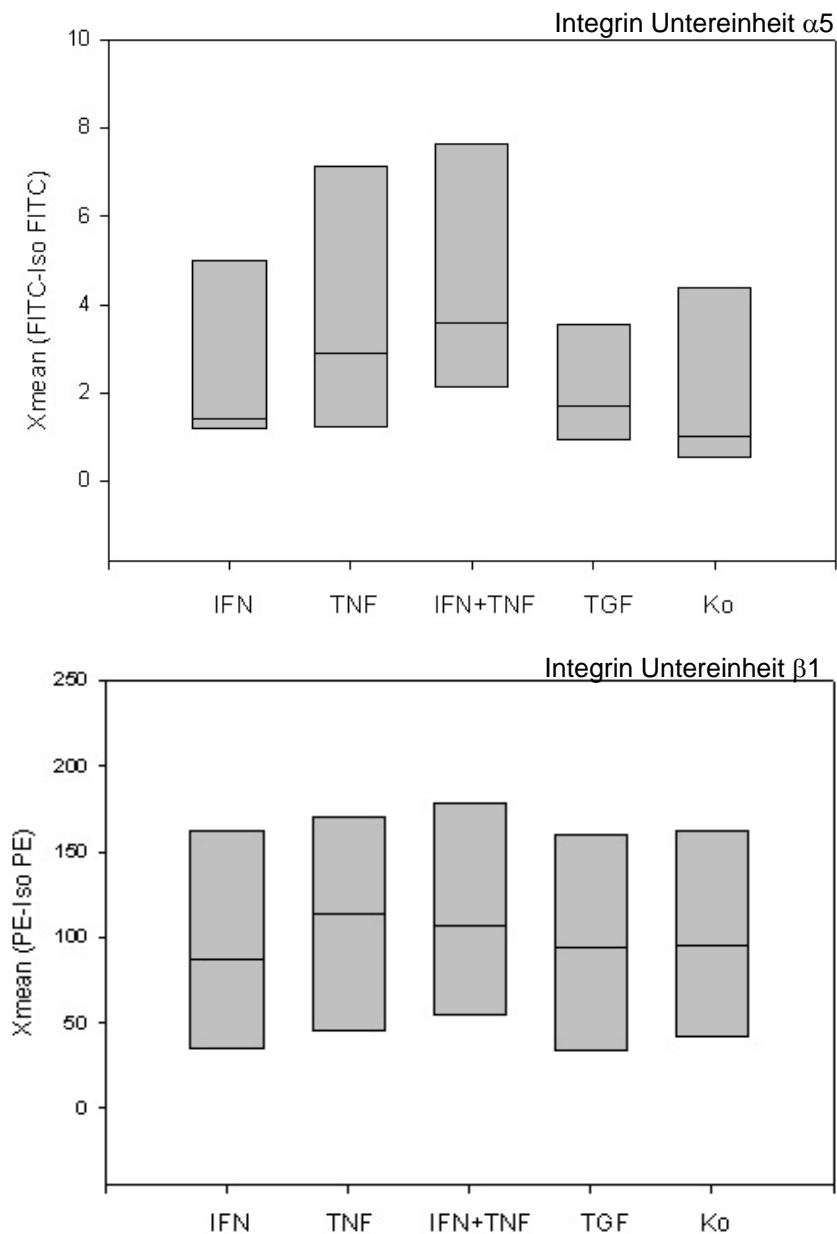
Vorerst wurde jedoch geprüft, ob die durch TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$  und/oder TNF modifizierte Migration von einer veränderten Integrin-Expression abhing. Dafür wurden Kontroll-CLPF für 72 h mit 10 ng/ml IFN- $\gamma$ , 20 ng/ml TNF, 10 ng/ml IFN- $\gamma$  und 20 ng/ml TNF sowie 20 pg/ml TGF- $\beta$ 1 in 6 ml serumfreien Fibroblasten-Medium inkubiert und auf Oberflächenexpression des Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 durch FACS-Analyse untersucht. Als unstimulierte Kontrolle wurden die Zellen nur mit serumfreiem Medium kultiviert.

Abbildung 5-10A zeigt Histogramme für die untersuchten CLPF-Kulturen, in denen die detektierte Fluoreszenz der untersuchten Integrin-Untereinheit und der dazugehörigen Isotyp-Kontrolle logarithmisch zur Zellzahl dargestellt ist. Die Fluoreszenz der Integrin  $\alpha$ 5- (hellgraues Histogramm) bzw.  $\beta$ 1- (dunkelgraues Histogramm) positiven Zellen ist im Histogramm im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle (weißes Histogramm) nach rechts verschoben. Es wurde eine Expression der Integrin Untereinheit  $\alpha$ 5 und  $\beta$ 1 auf allen Fibroblastenzelloberflächen mit FITC- und PE-konjugierten Antikörpern detektiert.



**Abbildung 5-10A: Darstellung repräsentativer FACS-Analysen der Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 Oberflächenexpression auf stimulierten humanen Kontroll-CLPF als Histogramm.** Die Zellen wurden mit FITC-gebundenem anti-integrin  $\alpha$ 5 (hellgraues Histogramm), PE-gebundenen anti-integrin  $\beta$ 1 (dunkelgraues Histogramm) und FITC- bzw. PE-gebundenem Kontroll- Antikörpern (weißes Histogramm) gefärbt. Die detektierte Fluoreszenzintensität ist auf der Abzisse logarithmisch und die Anzahl der entsprechend detektierten Zellen auf der Ordinate linear aufgetragen. Die Integrin  $\alpha$ 5 und  $\beta$ 1 Proteinexpression konnte auf der Oberfläche aller CLPF-Kulturen detektiert werden, Unterschiede konnten nicht beobachtet werden.

Um konkretere Aussagen hinsichtlich der Integrinexpression zu den verschiedenen CLPF-Kulturen geben zu können, wurden die ermittelten Mittel-MnX-Werte (mittlere Fluoreszenzintensität) der FITC und PE Fluoreszenz von fünf unabhängigen Experimenten statistisch beurteilt (Abbildung 5-10B). Es konnten dabei keine signifikanten Unterschiede durch Zytokinstimulation beobachtet werden. Weder für die Integrin Untereinheit  $\alpha$ 5 noch für  $\beta$ 1 wurden durch Zugabe von IFN- $\gamma$ , TNF, IFN- $\gamma$  und TNF oder TGF- $\beta$ 1 eine veränderte Integrinexpression nachgewiesen.



**Abbildung 5-10B: Graphische Darstellung der FACS-Analyse der Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 Expression in stimulierten humanen CLPF von Kontrollpatienten (n=5).** FACS-Analysen wurden an 5 Kontroll-CLPF Kulturen durchgeführt, die mit 10 ng/ml IFN- $\gamma$ , 20 ng/ml TNF, 10 ng/ml IFN- $\gamma$  und 20 ng/ml TNF oder 20 pg/ml TGF- $\beta$ 1 inkubiert worden waren. Signifikante Unterschiede der Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 Expression wurden in den untersuchten CLPF-Kulturen nicht gefunden.

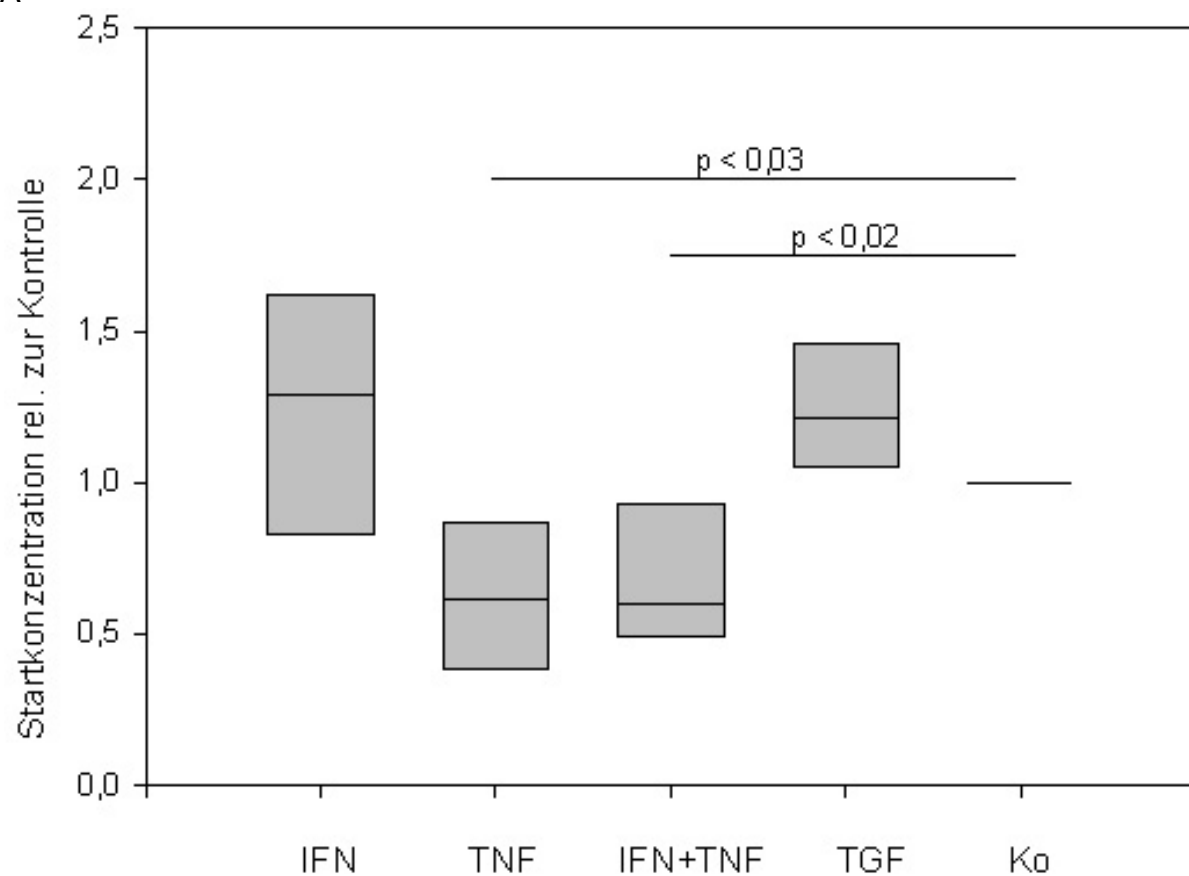
Nach dem sich die Integrinexpression auf behandelten und unbehandelten CLPF als unverändert erwies, wurde die Expression von FN und den Spleißformen ED-A und ED-B untersucht. Dafür wurden wieder Kontroll-CLPF mit 20 pg/ml TGF-  $\beta$ 1, 10 ng/ml IFN-  $\gamma$  und/oder 20 ng/ml TNF inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen gewaschen

und lysiert. Die isolierte Gesamt-RNA wurde revers transkribiert. Die dabei erhaltene cDNA wurde durch *real-time* PCR auf mRNA-Expression von FN, FN ED-A und ED-B untersucht. Die jeweilige FN-mRNA-Expression der unbehandelten Kontrolle jedes einzelnen Versuches wurde bei der Auswertung gleich 1 und die Expression der stimulierten CLPF dazu in Relation gesetzt. Die Ergebnisse von 7 unabhängigen Versuchen wurden zusammengefasst und statistisch bewertet.

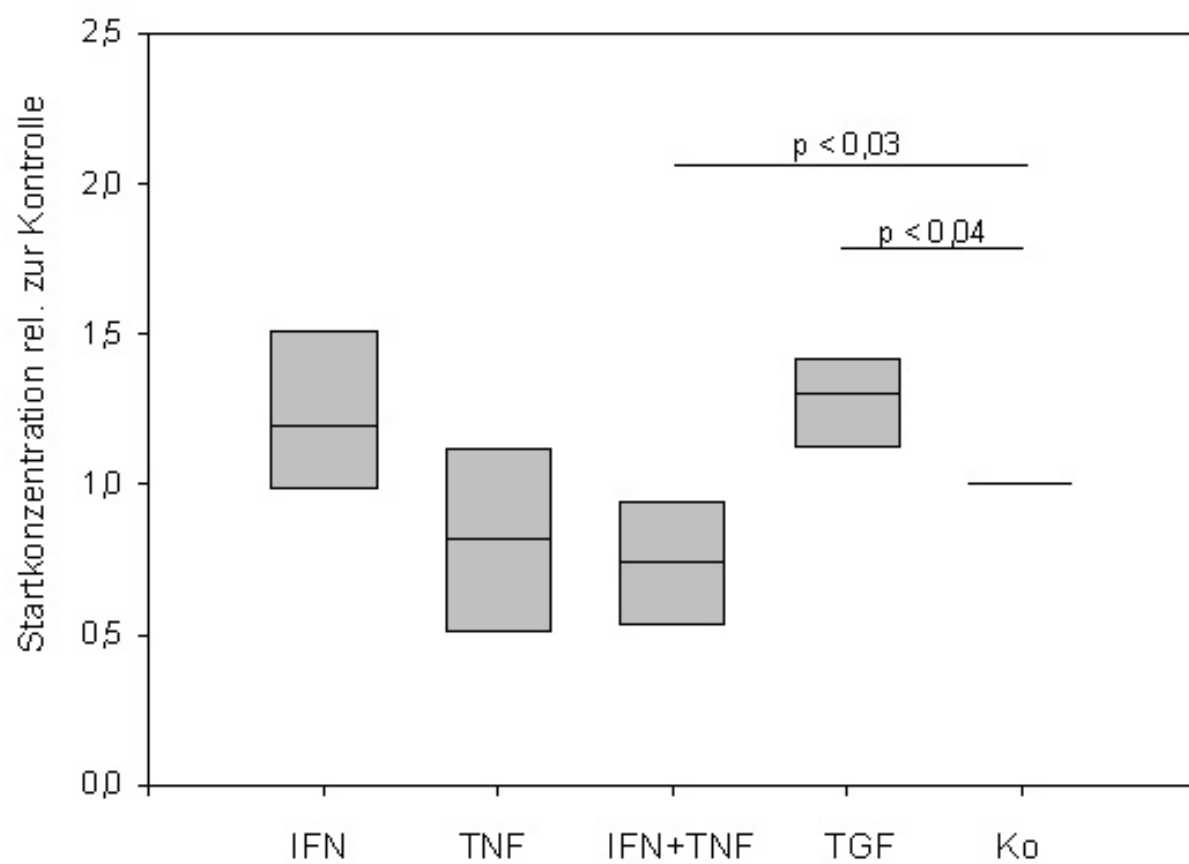
Bei der Untersuchung der mRNA-Expression von Gesamt-FN konnte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine vermehrte Expression durch TGF-  $\beta$ 1-Inkubation ( $p < 0,001$ ) beobachtet werden (Abbildung 5-11A). Durch Zugabe von TNF und IFN-  $\gamma$  /TNF zusammen zum Medium der Kontroll-CLPF wurde die Expression von Gesamt-FN im Durchschnitt um 30 % gehemmt ( $p < 0,03$ ). Dahin gegen hatte IFN-  $\gamma$  allein keinen signifikanten Effekt.

Bei der Analyse der ED-A (Abbildung 5-11B) und ED-B (Abbildung 5-11C) mRNA-Expression konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Eine TGF-  $\beta$ 1-Stimulation führte zu einer signifikanten 1,3 bzw. 1,5 fachen Steigerung der mRNA-Expression von FN ED-A bzw. FN ED-B (jeweils  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur Expression der Spleißformen-mRNA in unbehandelten Kontrollen. Eine Kombination von IFN-  $\gamma$  und TNF verringerte die mRNA-Expression der Spleißformen ED-A und ED-B signifikant um 25 % und 60 % ( $p < 0,03$  bzw.  $p < 0,001$ ). Verglichen mit den unstimulierten CLPF wurde durch Inkubation mit TNF die mRNA-Expression von ED-A und ED-B in den untersuchten Kontroll-CLPF ebenfalls reduziert (20 % bzw. 25 %), jedoch nur bei der Spleißform ED-B waren die Unterschiede signifikant ( $p < 0,03$ ). Eine durchschnittliche Reduktion der mRNA-Expression von FN ED-B um 15 % erfolgte durch IFN-  $\gamma$  Inkubation, erreichte jedoch keine Signifikanz.

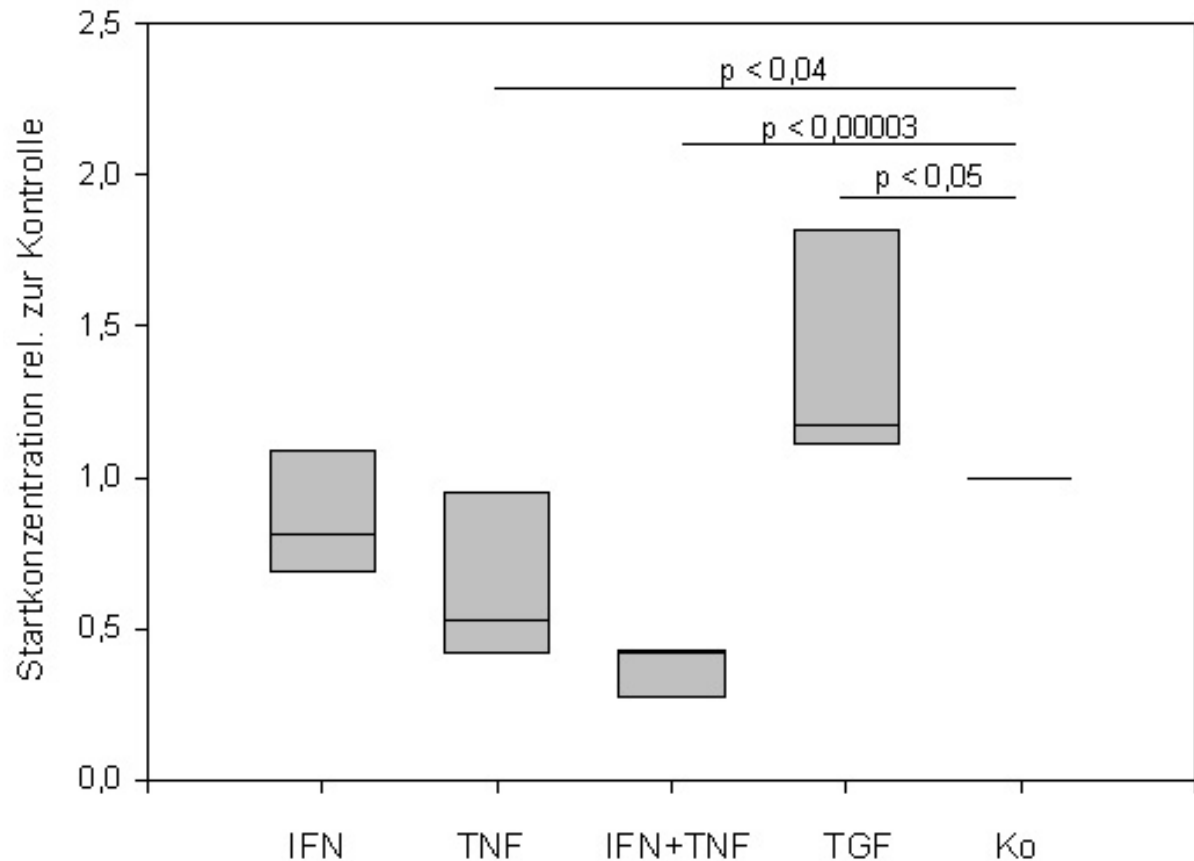
A



B



C



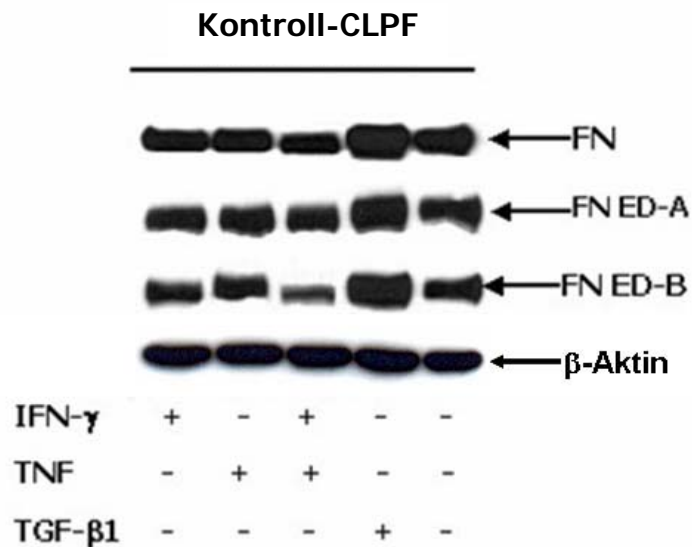
**Abbildung 5-11: Quantitative mRNA Analyse von FN (A) und den Spleißvarianten ED-A (B) und ED-B (C) mittels *real-time* PCR.** Die mRNA wurde aus stimulierten und unbehandelten Kontroll-CLPF isoliert. Die cDNA Startkonzentration der Kontrollgruppe wurde 1 gleichgesetzt. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle wurde durch TGF- $\beta$ 1-Inkubation eine Erhöhung der mRNA-Expression von FN, FN ED-A und ED-B beobachtet, während eine Stimulation mit IFN- $\gamma$  und TNF die Expression hemmte.

Statistik: *Paired* T-Test

Zur Bestätigung dieser Beobachtung wurde die Proteinexpression von FN und den Spleißvarianten mittels Western Blot untersucht.

Abbildung 5-12 zeigt einen repräsentativen Blot für den Nachweis von FN, FN ED-A und FN ED-B in stimulierten Kontroll-CLPF. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurde durch Zugabe von IFN- $\gamma$  und TNF die Proteinexpression von FN und den Spleißvarianten reduziert. Vor allem die Expression der Spleißvariante ED-B

wurde stark gesenkt. Das Zytokin TGF- $\beta$ 1 hingegen erhöhte die FN- und Isoformen-Proteinexpression im Gegensatz zur unstimulierten Kontrolle stark.



**Abbildung 5-12: Ein repräsentativer Western Blot von FN, FN ED-A und FN ED-B Proteinen in stimulierten und unbehandelten Kontroll-CLPF.** Die Proteine wurden mittels eines 8% SDS-PAGE Gels aufgetrennt und durch Western blotting mit Hilfe von Antikörpern gegen FN visualisiert. Die Beladung wurde mit  $\beta$ -Aktin überprüft. In den Lysaten der mit TGF- $\beta$ 1 stimulierten CLPF konnten höhere Mengen an FN-, FN ED-A und FN ED-B-Protein nachgewiesen werden. Eine Behandlung mit IFN- $\gamma$  und TNF senkte diese Proteinexpressionen. Diese Abbildung ist repräsentativ für 4 weitere Experimente.

Grundsätzlich zeigten Kontroll-CLPF, die für 3 Tage gleichzeitig mit IFN- $\gamma$  und TNF behandelt wurden, neben der bereits beobachteten verminderten Migrationsfähigkeit eine verminderte Expression an FN, FN ED-A und ED-B. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen wurden weniger mRNA-Transkripte und auch weniger Protein von FN und seinen Spleißformen nachgewiesen.

Im Gegensatz dazu zeigten mit TGF- $\beta$ 1 stimulierte Kontroll-CLPF eine FN-Expressionserhöhung. Zu einem wurden vermehrt mRNA-Transkripte von FN, FN ED-A und FN ED-B in den behandelten CLPF beobachtet, zum anderen zeigte sich

eine gesteigerte Expression der Proteine. Dies korrelierte mit der beschriebenen durch TGF- $\beta$ 1 gesteigerten und FN induzierten Migration.



### 5.3 Modulation von Kontroll-CLPF mit TGF- $\beta$ 1

#### 5.3.1 FN und Integrinexpression in mit TGF- $\beta$ 1 stimulierten Kontroll-CLPF

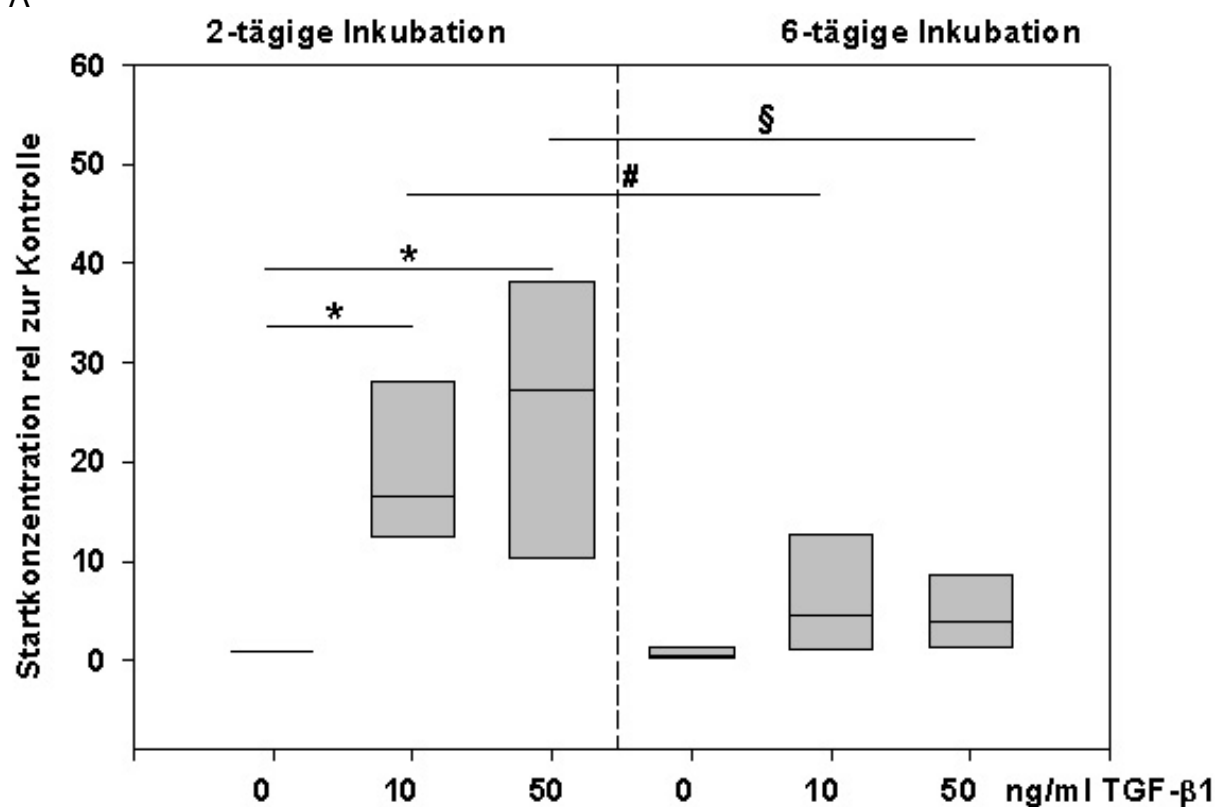
Da bekannt ist, dass TGF- $\beta$ 1 das Verbleiben der ED-A Domäne in FN begünstigt<sup>106</sup>,<sup>107</sup>, sollten Kontroll-CLPF mit verschiedenen und höheren als in 5.2 verwendeten TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen stimuliert werden, um eine FN-, FN ED-A- und FN ED-B-Expressionsveränderung zu untersuchen. Dafür sollten Kontroll-CLPF mit 10 ng/ml und 50 ng/ml TGF- $\beta$ 1 behandelt werden. Als Kontrolle wurden unstimulierte CLPF mitgeführt. Die Inkubation erfolgte für 2 und 6 Tage, da dem Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 ein biphasiger Effekt zugeschrieben wird. Bei vorangegangenen Migrationsversuchen zeigten intestinale CLPF bei einer Langzeitinkubation von 6 Tagen mit TGF- $\beta$ 1 ein reduziertes Migrationspotential, während eine 6 stündige Inkubation der Kontroll-CLPF mit TGF- $\beta$ 1 zu einer dosisabhängigen Steigerung der Zellmigration führte.

In dieser hier vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Veränderung der FN- und Spleißformexpression hinsichtlich der ansteigenden TGF- $\beta$ 1 Konzentration untersucht. Kontroll-CLPF wurden mit 0 ng/ml, 10 ng/ml und 50 ng/ml TGF- $\beta$ 1 inkubiert. Nach 48 h bzw. nach 6 Tagen wurden die Zellen gewaschen und lysiert. Die isolierte Gesamt-RNA wurde revers transkribiert. Die dabei erhaltene cDNA wurde durch *real-time* PCR auf mRNA-Expression von FN, FN ED-A und ED-B untersucht. Für die Auswertung wurde die unbehandelte 2 Tageskontrolle für die jeweilige FN-mRNA-Expression jedes einzelnen Versuches gleich 1 und die Expression der stimulierten CLPF in Relation gesetzt. Die Ergebnisse von 7 unabhängigen Versuchen wurden zusammengefasst und statistisch bewertet (Abbildung 5-14).

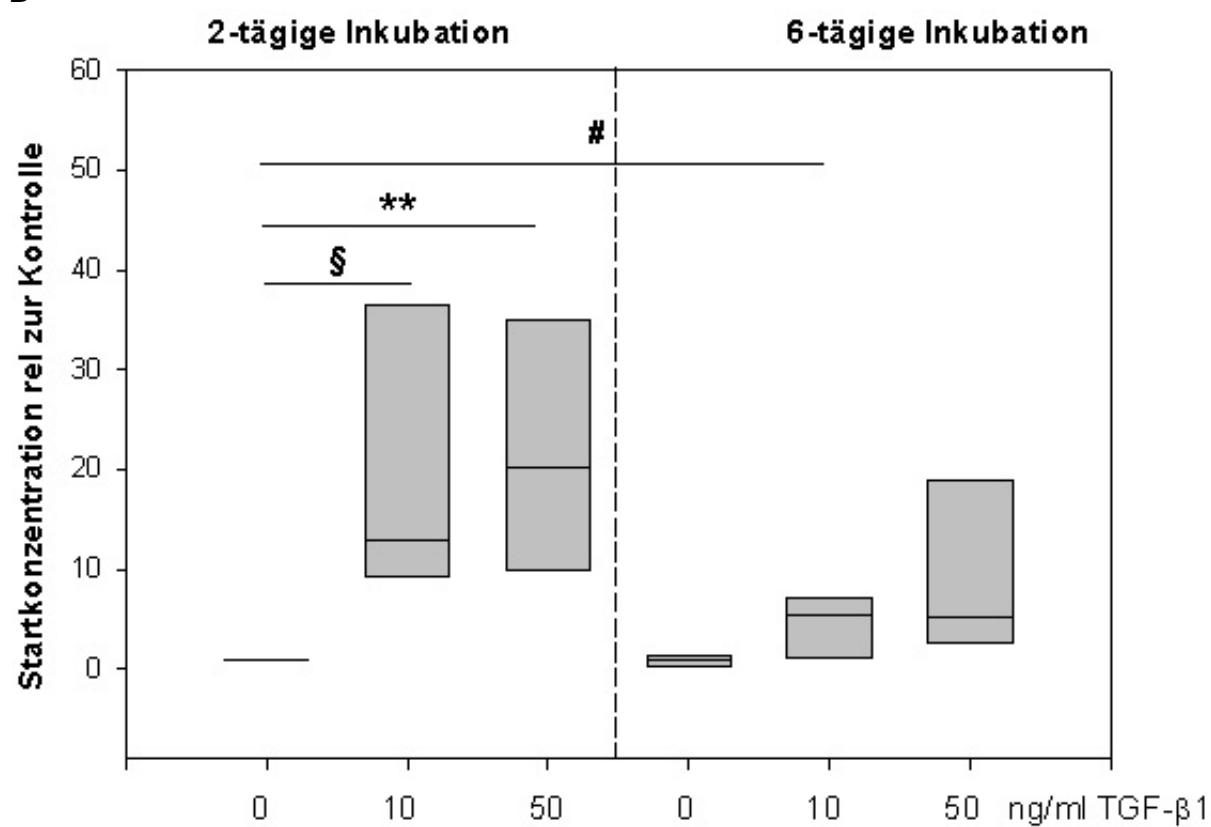
Die Gesamt-FN mRNA-Expression stieg durch 2-tägige Inkubation mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 im Median signifikant um das 20-fache (*Paired t-Test*;  $p < 0,002$ ) und mit 50 ng/ml TGF- $\beta$ 1 um das 26-fache an ( $p < 0,002$ ). Durch 6-tägige Inkubation hingegen kam es mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 zu einem 6-fachen FN mRNA-Expressionsanstieg und mit 50 ng/ml TGF- $\beta$ 1 zu einem 10-fachen Anstieg. Die mRNA-Expression von FN ED-A stieg durch Inkubation mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 nach 2 Tagesinkubation durchschnittlich um das 20-fache ( $p < 0,04$ ) und von FN ED-B um das 13-fache ( $p < 0,002$ ), während nach 6 Tagen Stimulation ein Expressionsanstieg um das 5-fache (FN ED-A,  $p = 0,04$ ) bzw. 3-fache (FN ED-B, n. s.) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet werden konnte. Mit 50 ng/ml TGF- $\beta$ 1 war FN ED-A mRNA nach einer 48h-Inkubation im Median 23 fach ( $p < 0,009$ ) und nach 6 Tagen 6 fach stärker exprimiert. Ein FN ED-B mRNA-Expressionsanstieg durch 50 ng/ml TGF- $\beta$ 1-Inkubation wurde im Median nach 2 Tagen um das 15 fache ( $p < 0,006$ ) und nach 6 Tagen um das 4 fache signifikant im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nachgewiesen.

Es konnte somit durch eine 2 tägige TGF- $\beta$ 1-Inkubation eine starke und dosisabhängige Expressionssteigerung von FN und seinen Isoformen erzielt werden, die nach 6 Tagen wieder abflachte, aber immer noch dosisabhängig verlief. Durchschnittlich sank der mRNA-Expressionsanstieg von Gesamt-FN im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle durch Zugabe von 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 zum Inkubationsmedium um 70 % in der Zeit von 2d auf 6d ( $p < 0,04$ ), während die FN ED-A und FN ED-B ( $p < 0,02$ ) mRNA-Expression sogar um 80 % niedriger beobachtet wurde. Mit 50 ng/ml TGF- $\beta$ 1 reduzierte sich im Inkubationsverlauf von 2 auf 6 Tage die Expression der mRNA von Gesamt-FN um 55 % ( $p < 0,02$ ), von FN ED-A und FN ED-B ( $p = 0,05$ ) um 75 %.

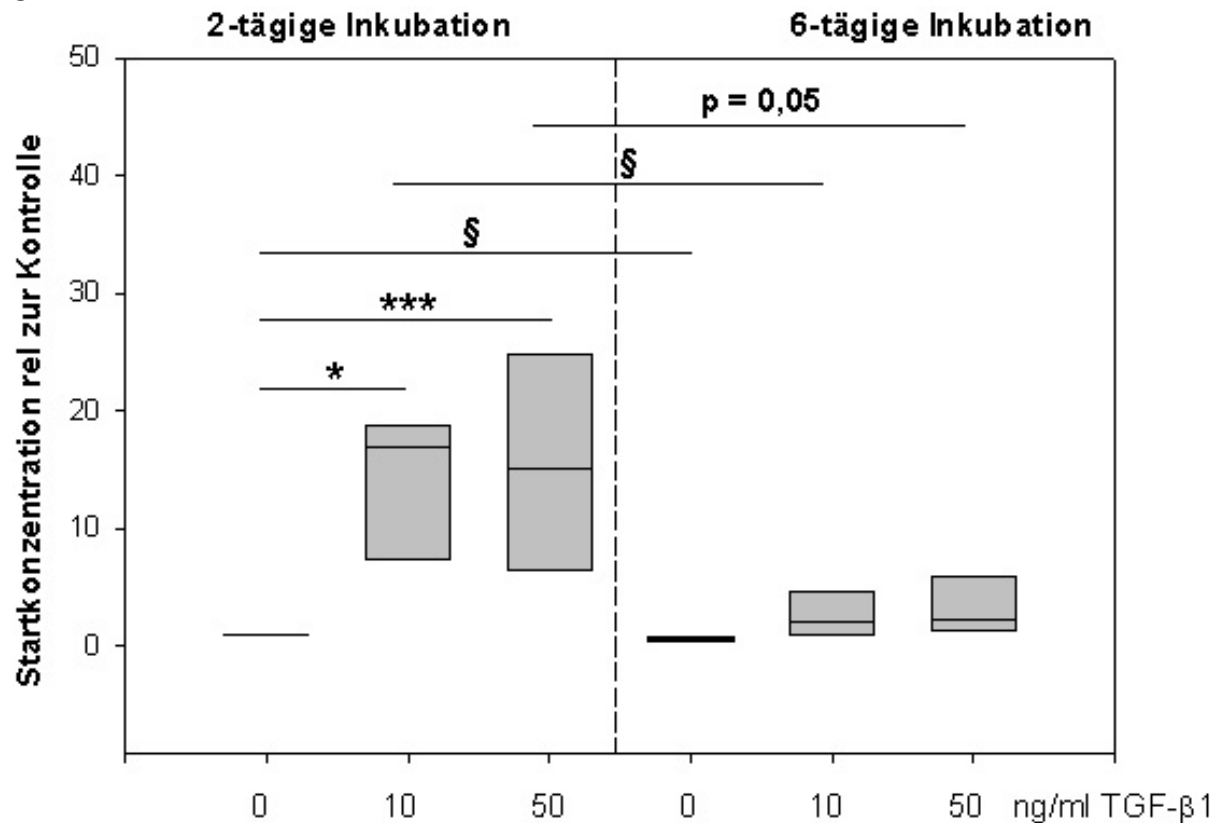
A



B



C

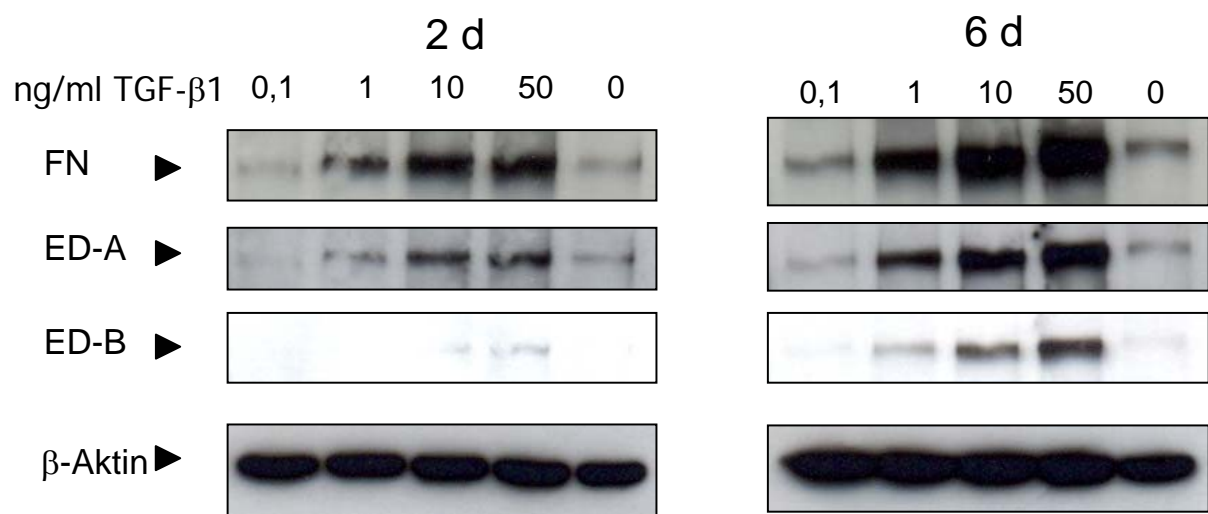


**Abbildung 5-14: Quantitative mRNA Analyse von FN (A) und den Spleißvarianten ED-A (B) und ED-B (C) mittels *real-time* PCR.** Die mRNA wurde aus mit TGF- $\beta$ 1 stimulierten und unbehandelten Kontroll-CLPF isoliert. Die cDNA Startkonzentration der Kontrollgruppe wurde 1 gleichgesetzt. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle wurde durch TGF- $\beta$ 1-Inkubation eine dosisabhängige Erhöhung der mRNA-Expression von FN, FN ED-A und ED-B beobachtet. Eine TGF- $\beta$ 1-Stimulation bewirkte nach 48 h einen höheren mRNA-Expressionsanstieg als nach 6 Tagen.

Paired t-Test: \* p < 0,002; \*\* p < 0,009; \*\*\* p < 0,006; # p < 0,04; § p < 0,02

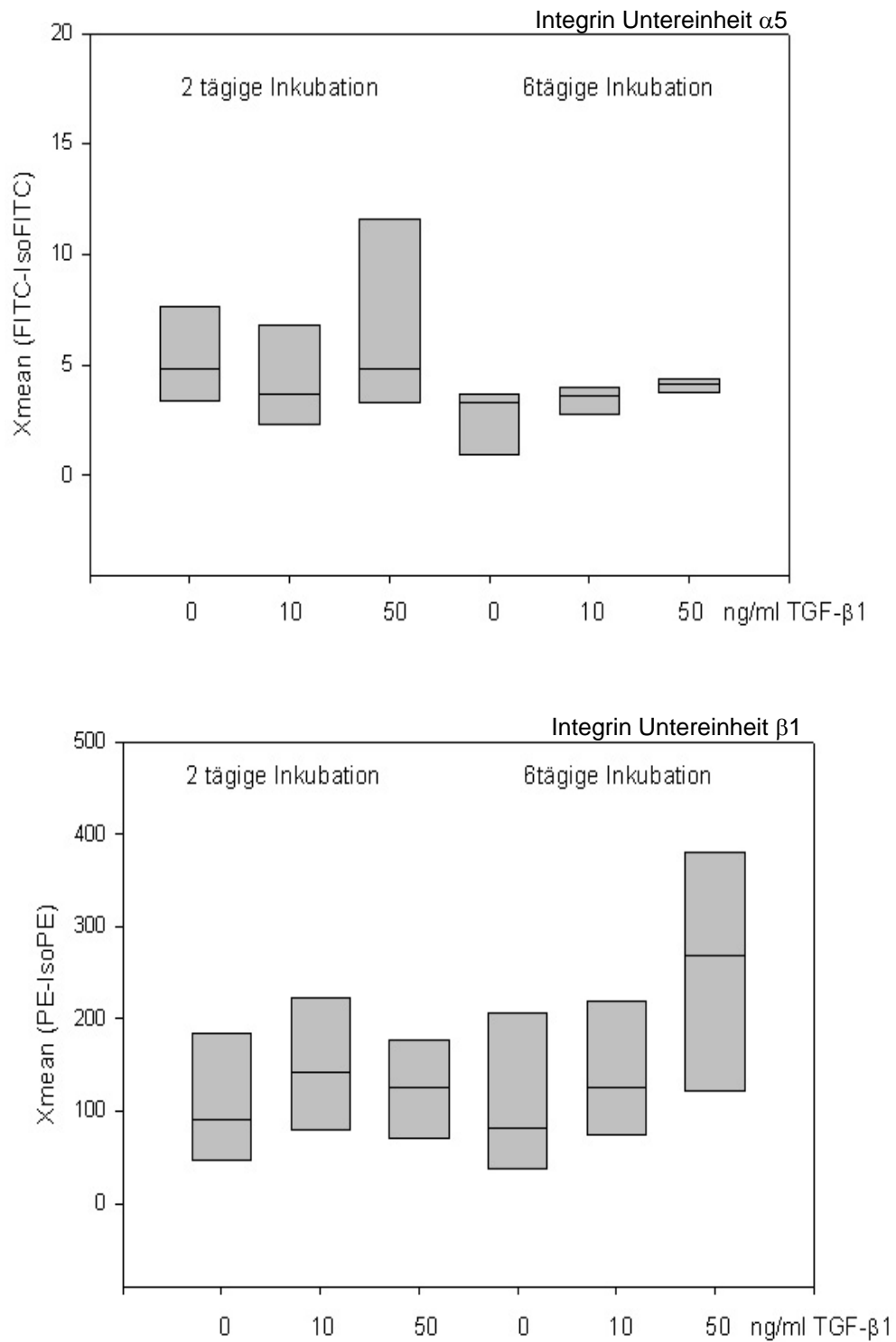
Diese beobachteten mRNA-Expressionsanstiege wurden auf Proteinebene überprüft. Dafür wurden die Kontrollzellen mit 0; 0,1; 1; 10 und 50 ng/ml TGF- $\beta$ 1 für 2 und 6 Tage stimuliert, lysiert und anschließend gleiche Mengen an erhaltenem Gesamtprotein auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Durch Western Blot Analyse wurden die Proteine von FN und den FN Spleißvarianten visualisiert. Dosisabhängig konnte ein Anstieg an FN, FN ED-A und FN ED-B beobachtet werden (Abbildung 5-15). Es war nach 6 Tagen mehr FN, FN ED-A und ED-B Proteinexpression als nach nur 2 Tagen zu beobachten. Ohne die Zugabe von TGF-

$\beta$ 1 war die Proteinexpression sehr gering und unterschied sich kaum zwischen den zwei Inkubationszeiträumen. Eine Inkubation der Kontroll-CLPF mit 0,1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 zeigte im Western Blot keine eindeutige Steigerung der FN und Isoformen Proteinexpression. Mit 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 im serumfreien Medium wurde eine Expressionssteigerung von FN und FN ED-A Protein nach 2 und 6 Tagen im Vergleich zu den unbehandelten Proben bewirkt. Eine FN ED-B Proteinexpression war im Western Blot nach 2 Tagesinkubationen nur bei den Konzentrationen von 10 und 50 ng/ml TGF- $\beta$ 1 zu sehen. Nach 6 Tagen konnte bei 1, 10 und 50 ng/ml TGF- $\beta$ 1 FN ED-B deutlich beobachtet werden. Durch 50 ng/ml TGF- $\beta$ 1 konnte die höchste Stimulation der Proteinexpression von FN, FN ED-A und ED-B erreicht werden.



**Abbildung 5-15: Ein repräsentativer Western Blot von FN, FN ED-A und FN ED-B Proteinen in mit TGF- $\beta$ 1 stimulierten und unbehandelten Kontroll-CLPF nach 2 und 6 Tagen.** Die Proteine wurden mittels eines 8% SDS-PAGE Gels aufgetrennt und durch Western blotting mit Hilfe von Antikörpern gegen FN visualisiert. Durch Inkubation mit TGF- $\beta$ 1 konnte eine dosisabhängige Proteinexpressionssteigerung nachgewiesen werden. Nach 6 Tagen war mehr Protein des Gesamt-FN und jeder FN Spleißvariante als nach 2 Tagen zu finden. Die Beladung wurde durch  $\beta$ -Aktin überprüft. Diese Abbildung ist repräsentativ für 2 weitere Experimente.

Da bei der Migration von Zellen die adhäsive Wechselwirkung zwischen EZM-Proteinen wie FN und Integrinen wichtig ist, wurde wieder die Integrinexpression mit Hilfe von FACS-Analysen überprüft. Dafür wurden 5 verschiedene Kontroll-CLPF für 2 bzw. 6 Tage mit serumfreien Medium und 0 ng/ml, 10 ng/ml sowie 50 ng/ml TGF- $\beta$ 1 inkubiert. Nach dem Ernten der Zellen wurde einerseits gegen die Integrinuntereinheit  $\alpha$ 5, andererseits gegen die Untereinheit  $\beta$ 1 und die dazugehörigen Isotypkontrollen gefärbt. Die bei der Durchflusszytometrie gemessene durchschnittliche Fluoreszenz (Xmean) der Isotyp-Kontrolle wurde von der der jeweiligen Integrinuntereinheit abgezogen. Bei der Auswertung der Daten konnte weder bei der Integrinuntereinheit  $\alpha$ 5 noch bei  $\beta$ 1 ein signifikanter Unterschied beobachtet werden (Abbildung 5-13). Tendenziell war jedoch nach einer 6 tägigen Inkubation mit ansteigender TGF- $\beta$ 1 Konzentration auch eine leicht steigende Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Proteinexpression zu verzeichnen, die jedoch keine Signifikanz erreichte.



**Abbildung 5-13: Graphische Darstellung der FACS-Analyse der Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 Expression in stimulierten humanen CLPF von Kontrollpatienten (n=5).** FACS-Analysen wurden an 5 Kontroll-CLPF Kulturen durchgeführt, die mit 0 ng/ml, 10 ng/ml und 50 ng/ml TGF- $\beta$ 1 für 2 und 6 Tage inkubiert wurden. Signifikante Unterschiede der Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 Expression wurden in den untersuchten CLPF-Kulturen nicht gefunden.

Durch Zugabe von ansteigenden Konzentrationen an TGF- $\beta$ 1 konnte eine dosisabhängige Expressionszunahme an FN, FN ED-A und FN ED-B auf mRNA- und auf Proteinebene beobachtet werden. So konnte nach 2 Tagen ein Anstieg der mRNA-Expression von FN und den Spleißvarianten FN ED-A und FN ED-B beobachtet werden, der nach einer 6 tägigen TGF- $\beta$ 1-Stimulation um durchschnittlich 75 % niedriger verlief. Dahingegen konnte auf Proteinebene nach 6 Tagen eine höhere Expression des Gesamt-FN und jeder FN Spleißvariante hinsichtlich der unstimulierten Kontrolle als nach 2 Tagen beobachtet werden, während sich die Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 Expression kaum änderte.



### 5.3.2 FN und Integrinexpression in mit TGF- $\beta$ 1 vorbehandelten Kontroll-CLPF und PDGF-Stimulation im Verwundungsassay

Die dynamische adhäsive Wechselwirkung zwischen Integrinen und EZM hat bei der Migration von Zellen eine Schlüsselfunktion. Durch Cluster- und Integrin-Rezeptor-Bildung kommt es zu einer Ausbildung von fokalen Adhäsionen, in denen man eine Phosphorylierung der *focal adhesion kinase* (FAK) findet. Die Phosphorylierung dieser rezeptorfreen 125 kDa Tyrosin-Kinase ist von einer Reihe verschiedener Stimuli, die auch die Zellmorphologie, -adhäsion und -bewegung regulieren, abhängig. Die Migration durch Integrine und Wachstumsfaktorenrezeptoren wird durch die Autophosphorylierung von FAK am Tyrosinrest 397 induziert. Die Phosphorylierung an dieser Stelle schafft eine SH<sub>2</sub>-Bindungsstelle für viele verschiedene *signaling*- und Adapterproteine<sup>37</sup> und ist ein Maß für die Aktivierung der FAK. In vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass CLPF, die zum Beispiel aufgrund von Zytokinstimulation mit IFN- $\gamma$  und TNF ein geringeres Migrationspotential zeigten, auch weniger FAK-Protein exprimierten und eine geringere Autophosphorylierung aufwiesen<sup>128</sup>. Wie bereits in 5.3.1 erwähnt, zeigten andere Untersuchungen bei einer kurzen Inkubation der Kontroll-CLPF mit TGF- $\beta$ 1 für 6 Stunden eine dosisabhängige Steigerung der Zellmigration. Im Gegensatz dazu, führte eine Langzeitinkubation von 6 Tagen mit TGF- $\beta$ 1 zu einer Differenzierung der intestinalen CLPF in Myofibroblasten mit einer gesteigerten  $\alpha$ -Aktinexpression und einem reduzierten Migrationspotential, das selbst durch Zugabe von Wachstumsfaktoren wie PDGF-AB nicht wieder restituiert werden konnte, während TGF- $\beta$ 1 unbehandelte Zellen erneut eine starke und dosisabhängige Migration aufwiesen.

Nun stellte sich die Frage, inwiefern diese Inkubation mit TGF- $\beta$ 1 und PDGF-AB die Expression von FN beeinflusst. Dafür wurden Kontroll-CLPF mit 0 bzw. 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 im serumfreien Medium für 6 Tage vorinkubiert und nach einer Verwundung mit dem Kamm für weitere 4 h mit verschiedenen Konzentrationen (0, 5, 10, 20 ng/ml) des Wachstumsfaktors PDGF-AB im konditionierten Medium inkubiert, um die Migration der Zellen zu initiieren. PDGF ist für Fibroblasten aus den verschiedensten Organen ein potentes Mitogen und Chemoattraktans und spielt eine zentrale Rolle bei der Fibrogenese. Nach einer Verwundung führt der Wachstumsfaktor im konditionierten Medium zu einer Induktion der Zellmigration.

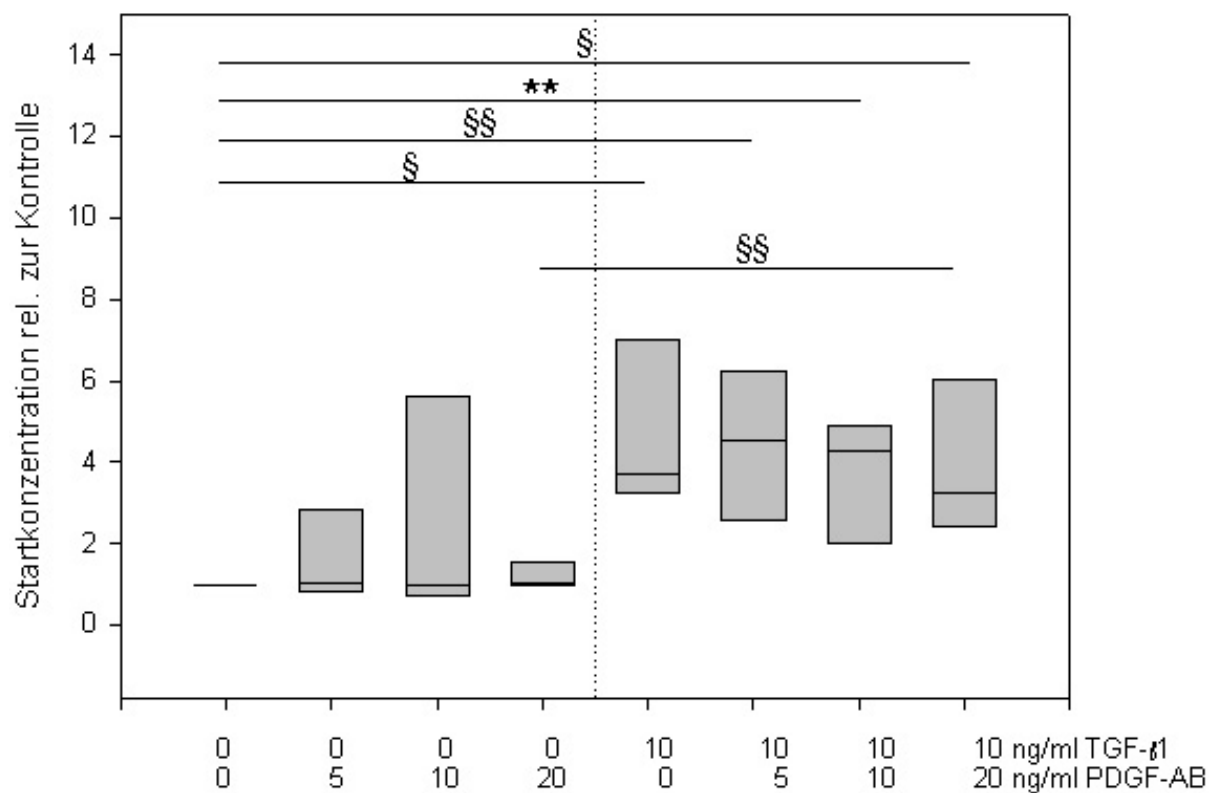
Abbildung 5-15 zeigt die quantitative Analyse der isolierten mRNA von 5 unabhängigen Experimenten. Die mRNA-Expression der ohne TGF- $\beta$ 1 und ohne PDGF-AB behandelten Kontrolle wurden 1 gleichgesetzt und die mRNA-Expression der stimulierten Zellen in Relation gesetzt. Während die nicht vorbehandelten Zellen durch die Zugabe von PDGF-AB eine leichte Expressionssteigerung von FN-, FN ED-A- und FN ED-B-mRNA zur Folge hatten, zeigten die mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 vorinkubierten Zellen einen stärkeren Anstieg der mRNA-Expression von FN und seinen Spleißvarianten. Eine Stimulation mit 5 ng/ml PDGF-AB für 4 h im konditionierten Medium führte in TGF- $\beta$ 1 unbehandelten Kontroll-CLPF zu einer Verdopplung der mRNA-Expression von FN und FN ED-B, die aufgrund der Standardabweichungen nicht signifikant war. Die mRNA-Expression von FN ED-A war dahingegen signifikant um das 1,5 fache höher (*Paired t-Test*;  $p < 0,05$ ) als die der PDGF-unbehandelten Probe. In mit TGF- $\beta$ 1 vorinkubierten CLPF bewirkte 5 ng/ml PDGF-AB verglichen mit der unstimulierten Kontrolle eine signifikante Erhöhung der mRNA-Level um das 3 fache (FN ED-A ( $p < 0,003$ ) und FN ED-B ( $p < 0,01$ )) und das 4,5 fache (FN ( $p < 0,03$ )). 10 ng/ml PDGF-AB führten bei diesen

Zellen zu einer 2,5 fachen Expressionssteigerung der mRNA der Isoformen FN ED-A und FN ED-B ( $p < 0,006$  und  $p < 0,009$ ) bzw. zu einer Vervierfachung der Gesamt-FN-mRNA ( $p < 0,009$ ), während die Expression der mRNA in TGF- $\beta$ 1 unstimulierten Zellen im Gegensatz zu den Kontrollen 3,5 fach höher (FN und FN ED-A) war bzw. sich nur verdoppelte (FN ED-B). Eine 4 stündige Behandlung mit 20 ng/ml PDGF-AB steigerte in den vorinkubierten Kontroll-CLPF im Vergleich zu den TGF- $\beta$ 1- und PDGF-unbehandelten Zellen, die mRNA-Expression um das 4,5-, 4- bzw. 3-fache (FN ( $p < 0,02$ ), FN ED-A ( $p < 0,04$ ) bzw. FN ED-B ( $p < 0,006$ )). Wurden die CLPF nicht mit TGF- $\beta$ 1 stimuliert, war eine mRNA-Expressionssteigerung um 50 % (FN ED-A ( $p < 0,02$ ), FN und FN ED-B (n. s.)) zu beobachten.

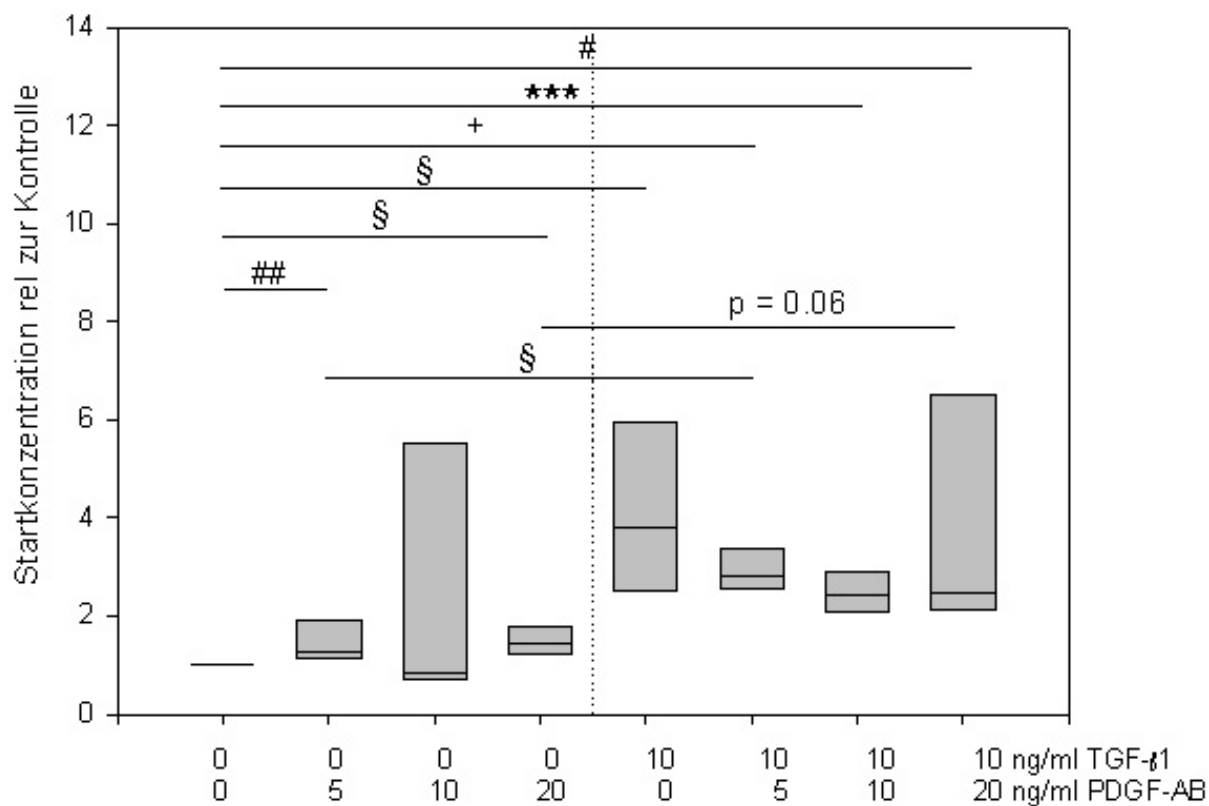
Bei der Betrachtung des Einflusses von PDGF-AB im konditionierten Medium auf die FN mRNA-Expression konnte man beobachten, dass eine Vorinkubation mit TGF- $\beta$ 1 eine stärkere Erhöhung bewirkte als eine Inkubation mit serumfreien Medium. Während bei TGF- $\beta$ 1 die mRNA-Expression am höchsten ohne und mit 20 ng/ml PDGF-AB zu beobachten war, führte ohne Vorinkubation 10 ng/ml PDGF-AB zur stärksten mRNA-Expressionssteigerung der FN Spleißformen. Durchschnittlich stieg die mRNA-Expression von Gesamt-FN, FN ED-A und FN ED-B nach TGF- $\beta$ 1-Inkubation nach der Verwundung ohne PDGF-AB signifikant um das 4 fache im Gegensatz zu der TGF- $\beta$ 1- und PDGF-unbehandelten Kontrolle ( $p < 0,02$  für FN und FN ED-A; FN ED-B  $p < 0,005$ ). Mit 5 ng/ml des migrationsinduzierenden Wachstumsfaktors im konditionierten Medium verdoppelte sich die mRNA-Expression der FN Spleißvarianten bei einer TGF- $\beta$ 1-Stimulation (FN ED-A ( $p < 0,02$ )). Die mRNA-Expression von FN und FN ED-B stieg im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle durch Vorstimulation mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 nur um 20 %, während die FN ED-A mRNA-Expression sogar um 30 % niedriger beobachtet

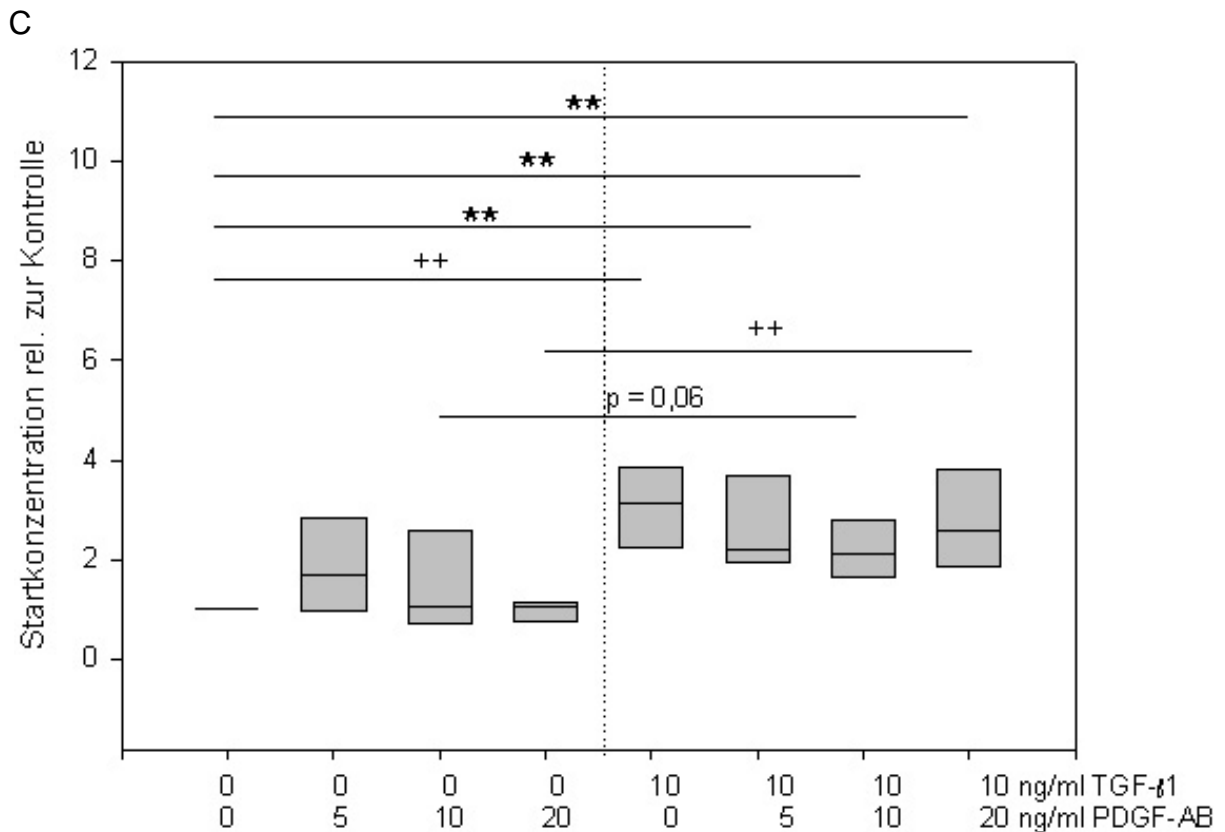
wurde. Mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 und 20 ng/ml PDGF-AB nach der Verwundung der Zellen stieg die mRNA-Expression von Gesamt-FN um 3 fache ( $p < 0,03$ ), von FN ED-A um das 2,5 fache ( $p = 0,06$ ) und die FN ED-B-mRNA ( $p < 0,005$ ) verdoppelte sich.

A



B





**Abbildung 5-16: Quantitative mRNA Analyse von FN (A) und den Spleißvarianten ED-A (B) und ED-B (C) mittels *real-time* PCR.** Kontroll-CLPF (n = 7) wurden für 6 Tage mit und ohne TGF- $\beta$ 1 vorinkubiert, mit einem Kamm verwundet, für weitere 4 h mit verschiedenen Konzentrationen an PDGF-AB behandelt. Die mRNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Für die Auswertung wurde die cDNA Startkonzentration der Kontrollgruppe 1 gleichgesetzt.

*Paired t-Test*: \*\* p < 0,009; \*\*\* p < 0,006; § p < 0,02; §§ p < 0,03; # p < 0,04; ## p < 0,05; + p < 0,003; ++ p < 0,005

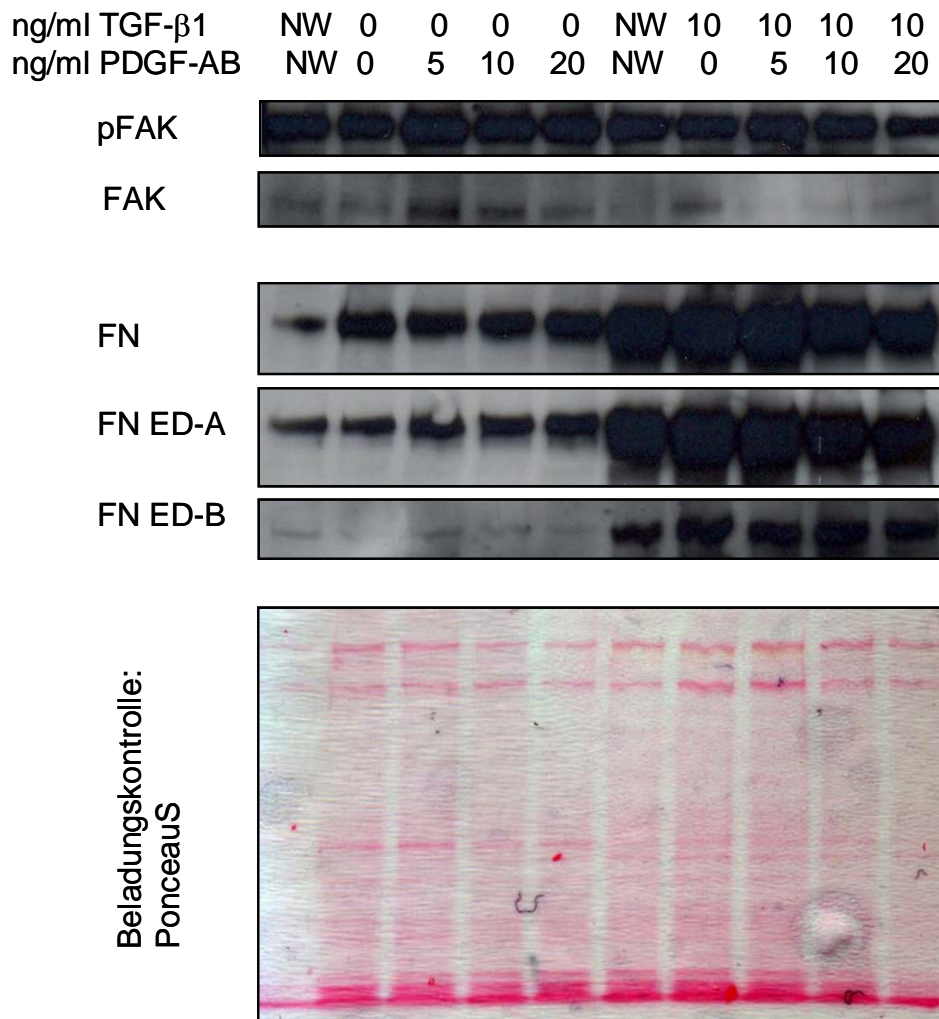
Der Wachstumsfaktor PDGF-AB wurde als Induktor der Migration von CLPF beobachtet<sup>190</sup> und deshalb nach der Verwundung des Zell-Monolayers als Stimulanz ins konditionierte Medium gegeben. Zellen, die daraufhin durch ein geringeres Migrationspotential gekennzeichnet waren, exprimierten auch weniger FAK-Protein und zeigten eine geringere FAK-Autophosphorylierung<sup>128</sup>, während eine stärkere Migration auch mit einer höheren Phosphorylierung in CLPF (S.N. Leeb, persönliche Mitteilung) und in anderen Zellen wie Keratinozyten<sup>199</sup> assoziiert war. Das beobachtete trotz PDGF-Induktion reduzierte Migrationsverhalten intestinaler

Kontroll-CLPF bei einer Langzeitinkubation von 6 Tagen mit TGF- $\beta$ 1 ging mit einer gesteigerten Expression der mRNA von FN und den Spleißformen FN ED-A und FN ED-B einher.

Im nächsten Schritt sollte nun überprüft werden, ob sich durch eine TGF- $\beta$ 1-Vorinkubation und anschließender Migrationsinduktion mit PDGF die Proteinlevel an FN, FN ED-A und FN ED-B ähnlich wie die Mengen der mRNA-Transkripte veränderten. Dafür wurden die Kontroll-CLPF, die mit 0 bzw. 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 im serumfreien Medium für 6 Tage vorinkubiert und nach einer Verwundung mit dem Kamm für weitere 4 h mit verschiedenen Konzentrationen (0, 5, 10, 20 ng/ml) des Wachstumsfaktors PDGF-AB im konditionierten Medium zur Migrationsinduktion stimuliert wurden, lysiert und die erhaltenen Proteinsuspensionen im Western Blot auf veränderte FN-, FN ED-A- und FN ED-B-Proteinmengen untersucht. Gleichzeitig sollten die Proteinlevel von FAK und phosphoryliertem FAK überprüft werden.

Abbildung 5-16 zeigt einen repräsentativen Blot der untersuchten Proteine. Durch Vorinkubation der Kontroll-CLPF mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 sank die FAK-Autophosphorylierung im Gegensatz zu den nicht vorbehandelten CLPF. Auch die Expression des FAK-Proteins wurde durch die TGF- $\beta$ 1-Vorinkubation reduziert. Ohne Zugabe von PDGF-AB zum konditionierten Medium nach der Verwundung des Monolayers war FAK-Protein nachweisbar. Durch Zugabe des Wachstumsfaktor nahm die Menge des FAK-Protein erheblich ab. Die Kontroll-CLPF, die nicht mit TGF- $\beta$ 1 vorstimuliert wurden, zeigten eine gesteigerte FAK-Proteinexpression, die am stärksten bei einer Konzentration von 5 ng/ml PDGF-AB war. Die Proteinexpression von FN, FN ED-A und FN ED-B stieg durch Vorinkubation mit TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen stark an. Nach Verwundung und Zugabe von PDGF-AB und konditioniertem Medium erhöhte sich die

Proteinexpression der FNe verglichen mit der mitgeführten Kontrolle vor der Verwundung (Nullwert). Durch TGF- $\beta$ 1-Inkubation hingegen war dieser Unterschied zwischen dem Proteingehalt des Nullwerts und denen der verwundeten CLPF nicht zu beobachten.



**Abbildung 5-17:** Ein repräsentativer Western Blot von Phospho-FAK, FAK, FN, FN ED-A und FN ED-B Proteinen in mit und ohne TGF- $\beta$ 1 vorstimulierten Kontroll-CLPF (für 6 d), die nach einer Verwundung für 4 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von PDGF-AB behandelt wurden. Die Proteine wurden mittels eines 8% SDS-PAGE Gels aufgetrennt und durch Western blotting mit Hilfe von Antikörpern gegen FAK und FN visualisiert. Während phospho-FAK- und FAK-Proteinmengen durch TGF- $\beta$ 1-Vorinkubation sanken, stieg die Proteinexpression an FN, FN ED-A und ED-B im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Kontrollen. Die Beladung wurde durch PonceauS überprüft. Als Nullwert (NW) dienten Kontroll-CLPF-Lysate, die vor der Verwundung gewonnen wurden. Diese Abbildung ist repräsentativ für 2 weitere Experimente.

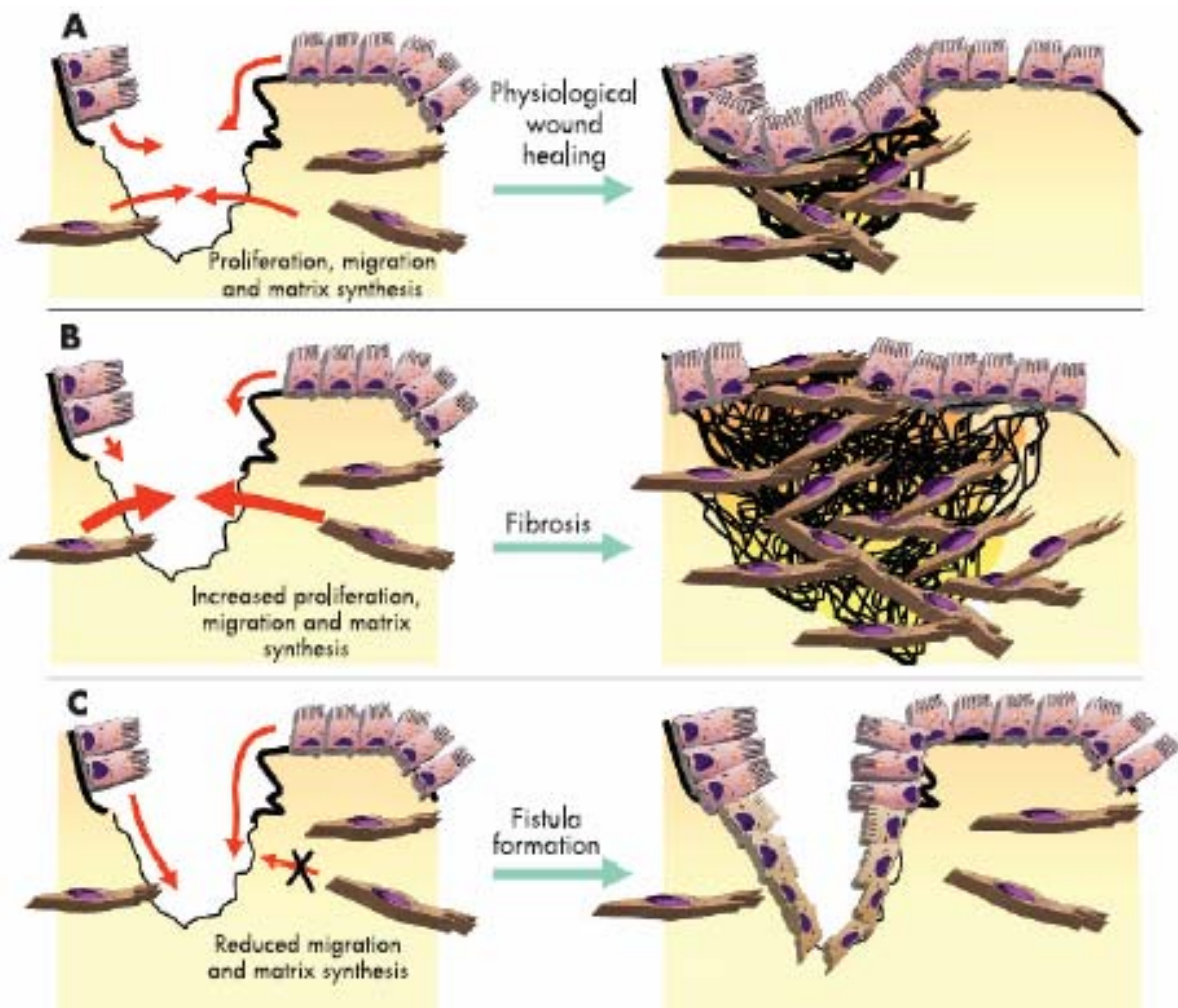


Durch Vorinkubation mit TGF- $\beta$ 1 exprimierten die untersuchten Kontroll-CLPF nach Verwundung und Zugabe von PDGF-AB im konditionierten Medium signifikant mehr mRNA von FN, FN ED-A und FN ED-B als die PDGF-unbehandelte Kontrolle und als die nicht mit TGF- $\beta$ 1 vorstimulierten Kontrollen. Während bei TGF- $\beta$ 1 die mRNA-Expression am höchsten ohne und mit 20 ng/ml PDGF-AB zu beobachten war, führte ohne Vorinkubation 10 ng/ml PDGF-AB zur stärksten mRNA-Expressionssteigerung der FN Spleißformen. Durchschnittlich stieg die mRNA-Expression von Gesamt-FN, FN ED-A und FN ED-B nach TGF- $\beta$ 1-Inkubation nach der Verwundung ohne PDGF-AB signifikant um das 4 fache im Gegensatz zu der TGF- $\beta$ 1- und PDGF-unbehandelten Kontrolle. Die FN-, FN ED-A- und FN ED-B-Proteinexpression konnte in den vorstimulierten im Gegensatz zu den nicht vorbehandelten CLPF stark vermehrt nachgewiesen werden. Die FAK-Phosphorylierung war -verglichen mit den unstimulierten Kontrollen- in den mit TGF- $\beta$ 1 inkubierten CLPF nach Verwundung und Migrationsinduktion durch PDGF reduziert. Auch die exprimierte FAK-Proteinmenge lag vermindert in diesen Zellen vor.

## 6. Diskussion

### 6.1 FN- und Integrinexpression bei CED

Das Wandern von Fibroblasten zum Ort der Gewebsverletzung ist eine initiale Notwendigkeit für die optimale Reparatur eines Gewebsschaden <sup>126</sup>. Vor kurzem konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass sich das Migrationspotential von CLPF in der Mukosa von Patienten mit MC unterscheidet. So zeigten aus MC-Mukosa isolierte CLPF ein signifikant reduziertes Migrationsverhalten im Vergleich zu CLPF aus nicht entzündeter Kontrollmukosa <sup>128</sup>. Des Weiteren migrierten CLPF, die aus Fisteln von MC-Patienten isoliert wurden, im Vergleich zu einfach entzündeten MC-CLPF weniger und MC-CLPF aus Stenosearealen mehr <sup>191</sup>. FN – im besonderen FN ED-A - ist dabei essentiell für die Induktion der CLPF Migration <sup>72, 189</sup>. Das durch FN induzierte Signal wird zu der Zelle über die Oberflächenrezeptoren der Integrinfamilie transferiert <sup>190</sup>. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst untersucht werden, ob eine veränderte FN-Spleißform- und/oder Integrinexpression mit den beobachteten Migrationsunterschieden in den CLPF Kulturen (Abbildung 6-1), die aus MC Mukosa isoliert wurden, assoziiert ist.



**Abbildung 6-1: Modell der Rolle der intestinalen CLPF bei (A) normaler Wundheilung, (B) Stenose- und (C) Fistelentstehung nach einer Gewebsverletzung** <sup>200</sup>. Eine verstärkte CLPF-Proliferation und -Migration und Synthese von EZM führt zu einer Stenose, während bei Fisteln eine reduzierte Migration der CLPF und Matrixsynthese besteht, die durch Proliferation und Migration der Epithelzellen kompensiert wird.

Die Expression des FN-Hauptoberflächenrezeptors, Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  <sup>80</sup>, war in den untersuchten verschiedenen CLPF Kulturen unverändert. AbiEzzi *et al.* konnten zeigen, dass eine Reduktion von FN normalerweise mit einem Integrin  $\alpha 5 \beta 1$ -Expressionsanstieg assoziiert ist <sup>201</sup>. Die Expression unterschiedlichster Integrine wurde in verschiedenen Fibroblastenkulturen untersucht <sup>202, 203</sup>, bisher jedoch noch nicht in CLPF, die aus intestinaler Mukosa isoliert wurde. In unserer Studie konnte bei den CLPF Kulturen verschiedensten Ursprungs weder auf mRNA- noch auf Proteinebene ein Unterschied in der Expression der Integrin Untereinheit  $\alpha 5$  und  $\beta 1$

beobachtet werden, so dass aufgrund der Beobachtungen eine verminderte oder gesteigerte Migrationsfähigkeit nicht von einer differenziellen Integrin  $\alpha 5\beta 1$ -Expression abhängig sein konnte.

Bezüglich der FN-Expression mit Plasma von Patienten mit und ohne MC gab es mehrere Untersuchungen von verschiedenen Arbeitsgruppen<sup>204-206</sup>. Allan *et al.* fanden reduzierte Konzentrationen an Plasma-FN und vermuteten, dass diese Reduktion von einer verminderten Produktion, einem erhöhten Metabolismus oder einer gesteigerten Deposition von FN in das Gewebe<sup>207</sup> abhing. In Stenosen von MC-Patienten fand eine andere Gruppe erhöhte Mengen an Plasma-FN und assoziierten das mit der Stenoseentstehung<sup>208</sup>.

Die Verteilung der zellulären FN Isoformen wurde bis zum heutigen Tag in verschiedenen Geweben wie Haut, Niere und Knochenmark untersucht<sup>209-211</sup> jedoch noch nicht in intestinaler Mukosa von Patienten mit MC. Van Vliet *et al.* zeigten, dass in Gebieten der Glomerulosklerose, in periglomerulären Regionen und intestinaler Fibrose der Nieren FN im Vergleich zu Kontrollen erhöht zu finden war. ED-A- und ED-B-positive FNe wurden in glomerulosklerotischen Läsionen erhöht exprimiert. In alten Glomeruli war die Menge an Gesamt-FN und FN ED-A im Gegensatz zu normaler mesangialer EZM signifikant reduziert, während FN ED-B erhöht exprimiert war<sup>210</sup>. Bei Untersuchungen des Morbus Dupuytren und normaler Aponeurose konnten FN, FN ED-A und FN ED-B in proliferativen und involuionalen Stadien des Morbus Dupuytren lokalisiert werden. FN ED-B wurde in diesem Zusammenhang geringer exprimiert gefunden als FN oder FN ED-A. Im rückständigen Gewebe zeigte sich eine signifikant verminderte Präsenz von FN und FN ED-A. FN ED-B konnte nicht nachgewiesen werden. In normaler Aponeurose konnten die Isoformen nicht beobachtet werden. Gesamt-FN konnte in immunhistochemischen Färbungen nur leicht und auf loses Bindegewebe in der Umgebung der großen Parallelbündeln der

Kollagenfasern beschränkt beobachtet werden<sup>209</sup>. Bei subtraktiven Hybridisierungen mit mRNA isoliert aus Stenosearealen von MC-Patienten und von Kontrollmukosa konnte in stenosierter Mukosa unter anderem eine erhöhte FN-mRNA Expression nachgewiesen werden<sup>192</sup>. Immunhistochemische und Western Blot Analysen dieser Studie bestätigten diese Beobachtungen auf Proteinebene.

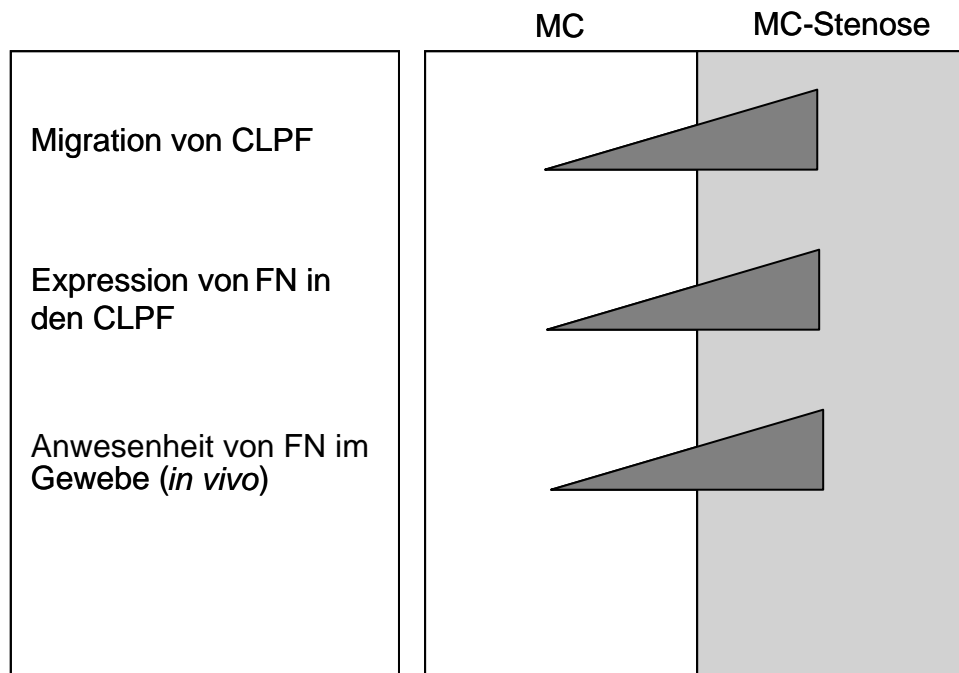
Neben Gesamt-FN wurden auch die Spleißformen ED-A und ED-B mittels Immunhistochemie untersucht, da FN ED-A ein wichtiger Induktor der CLPF-Migration ist<sup>72</sup>. Es konnten Unterschiede in der Verteilung der FN Spleißformen in intestinaler Mukosa von Kontrollpatienten und Patienten mit MC, MC-Stenose und MC-Fistel in den untersuchten Proben beobachtet werden. So waren FN ED-A und auch FN ED-B Protein in entzündeter MC-Mukosa im Vergleich zu Kontrollmukosa verringert exprimiert. Die durch Immunhistochemie nachgewiesene FN ED-B Proteinexpression konnte durch *real-time* PCR nicht bestätigt werden. Der Grund der Diskrepanz ist unklar. Eine mögliche Erklärung könnte eine erhöhte Degradation des ED-B Proteins in entzündeter Mukosa sein. Matrix-degradierende Enzyme konnten während mukosaler Entzündung erhöht nachgewiesen werden.

In Fisteln von MC-Patienten waren die Spleißformen durch immunhistochemische Färbungen nicht nachweisbar, während die Gesamt-FN Proteinexpression ähnlich der von Kontrollen war. Wenn Fisteln durch ein Migrationsdefizit von Fibroblasten mit verursacht werden und dort weniger FN ED-A zu finden ist, könnte die verminderte FN ED-A Expression ein Grund für die Fistelpathogenese sein. In stenosierter MC-Mukosa waren die Isoformen ED-A, ED-B und auch Gesamt-FN im Gegensatz zu den Fibronektinen in der Mukosa von Kontrollen erhöht. Ein Anstieg an ED-A und ED-B Proteinen konnten auch Van Vliet und seine Mitarbeiter bei Glomerulosklerose und interstitieller Fibrose humaner Nierenerkrankungen zeigen<sup>210</sup>. Ihrer Theorie nach führt die Ablagerung von ED-A-positivem FN zu einer effizienteren Anheftung

der Zellen an die EZM in den Nieren und könnte ein Teil des Gewebereparaturprozesses sein wie bei Stenosen des MC.

Grundsätzlich scheint FN ED-B in der intestinalen Mukosa im Vergleich zu Gesamt FN und ED-A geringer exprimiert zu sein. Reduzierte FN ED-B Proteinmengen wurden ebenfalls in anderen Erkrankungen wie Dupuytrensche Kontraktur oder in Wundarealen von Rattenhaut beobachtet<sup>62</sup>.

Nicht nur FN sondern auch die FN Spleißformen sind in der MC-Mukosa unterschiedlich exprimiert. Unzureichende Mengen der FN Isoform ED-A könnten zu einer reduzierten Migration der MC-CLPF, im Besonderen der MC-Fistel CLPF nach verminderten Wundheilung, führen. In Stenosearealen könnte die hochregulierte FN ED-A Synthese zu einer erhöhten Migration der CLPF beitragen. Diese Veränderungen lassen vermuten, dass sie relativ spezifisch für MC sind, da bei einer CU-Erkrankung die Expression von FN und seinen zwei Isoformen vom Grad der mukosalen Entzündung abhängig zu sein scheint. Bei Patienten mit Divertikulitis wurden keine signifikanten Unterschiede bei der FN und FN Isoformexpression beobachtet.



**Abbildung 6-2:** Übersicht über das Migrationsverhalten, die FN-Expression in den Geweben und CLPF, die aus einfach entzündeter und fibrotischer Mukosa von Patienten mit MC isoliert wurden.

## 6.2 IFN- $\gamma$ und TNF reduzieren die FN-Expression

Die proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF sind entzündliche Mediatoren, deren mRNA-Transkripte bei CED vermehrt exprimiert sind <sup>212, 213</sup>. Signifikante Erhöhungen an TNF mRNA-Transkripten konnten nur bei aktivem MC gezeigt werden, wobei ein leichter Gradient der Expression zu beobachten war <sup>213</sup>. TNF wurde basal stärker im Ileum als im Rektum transkribiert. Durch Gabe von Azathioprin und/oder Steroiden konnte eine signifikante Reduktion des proinflammatorischen Zytokins TNF nach 8 Wochen beobachtet werden <sup>213</sup>. Hohe Level an TNF aber auch an IL-1 $\beta$  steigern die Wahrscheinlichkeit eines wiederholten Ausbruchs der CED. IFN- $\gamma$  scheint hauptsächlich bei einer MC-Erkrankung erhöht exprimiert zu sein <sup>117, 122</sup>.

IFN- $\gamma$  und TNF spielen eine wichtige Rolle bei der Fibroblastenmigration. Interferone inhibieren die Zellbewegung <sup>123</sup>. Die Isoformen IFN- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  inhibieren die Migration von Hautfibroblasten dosisabhängig <sup>124</sup>, während TNF keine Migration induziert <sup>125</sup>. Es fungiert bei diesen Zellen <sup>126</sup> und bei *smooth muscle cells* der Aorta <sup>127</sup> als Chemoattraktant und Aktivator der Migration. Durch Vorinkubation mit TNF konnte das Einwandern dieser Hautfibroblasten in ein Kollagen I Gel verstärkt werden <sup>125</sup>. In unserer Arbeitsgruppe konnte durch verschiedene Konzentrationen von IFN- $\gamma$  oder TNF im konditionierten Medium eine dosisabhängige Reduktion der Migration von CLPF, die aus der gesunden Mukosa von Patienten isoliert wurden, gezeigt werden. Im Gegensatz zu unbehandelten Zellen zeigten für 3 Tage mit IFN- $\gamma$  und/oder TNF im konditionierten Medium vorinkubierte Kontroll-CLPF – selbst wenn sie für weitere 7 Tage ohne erneute Zugabe von Zytokinen im konditionierten Medium inkubiert wurden – ein signifikant geringeres Migrationspotential <sup>128</sup>.



Die Expression von FN, FN ED-A und FN ED-B wurde durch 3 tägige Inkubation reduziert. Eine Zugabe von 10 ng/ml IFN- $\gamma$  zum serumfreien Medium der Kontroll-CLPF veränderte die mRNA- und Proteinexpression nicht signifikant. Dahingegen führte eine Inkubation mit TNF sowie IFN- $\gamma$  und TNF zu einer signifikanten Reduktion der mRNA- und Proteinlevel von FN, FN ED-A und FN ED-B. Durch Zugabe von TNF und IFN- $\gamma$  /TNF zusammen zum Medium der Kontroll-CLPF wurde die Expression von Gesamt-FN mRNA im Durchschnitt um 30 % gehemmt. Verglichen mit den unstimulierten CLPF wurde durch Inkubation mit TNF die mRNA-Expression von FN ED-A und FN ED-B in den untersuchten Kontroll-CLPF ebenfalls reduziert (20 % bzw. 25 %). Eine Kombination von IFN- $\gamma$  und TNF verringerte die mRNA der Spleißformen ED-A und ED-B signifikant um 25 % und 60 %.

Die Integrinproteinexpression hingegen zeigte durch Stimulation mit IFN- $\gamma$  und/oder TNF keine signifikanten Unterschiede.

Wenn man die Ergebnisse, die *in vivo* und *in vitro* beobachtet wurden, zusammenbringt (Abbildung 6-3), konnte man erkennen, dass es möglich war, durch Stimulation von Kontroll-CLPF mit IFN- $\gamma$  und TNF ein entzündliches Millieu, das bei einer MC-Erkrankung besteht, zu initiieren. Eine Zugabe von IFN- $\gamma$  und TNF zum Medium von Kontroll-CLPF, führte zu einer Reduktion der Migration und der FN mRNA- und Proteinexpression, die auch bei CLPF, die aus der Mukosa von Patienten mit MC isoliert wurden, gezeigt werden konnte.

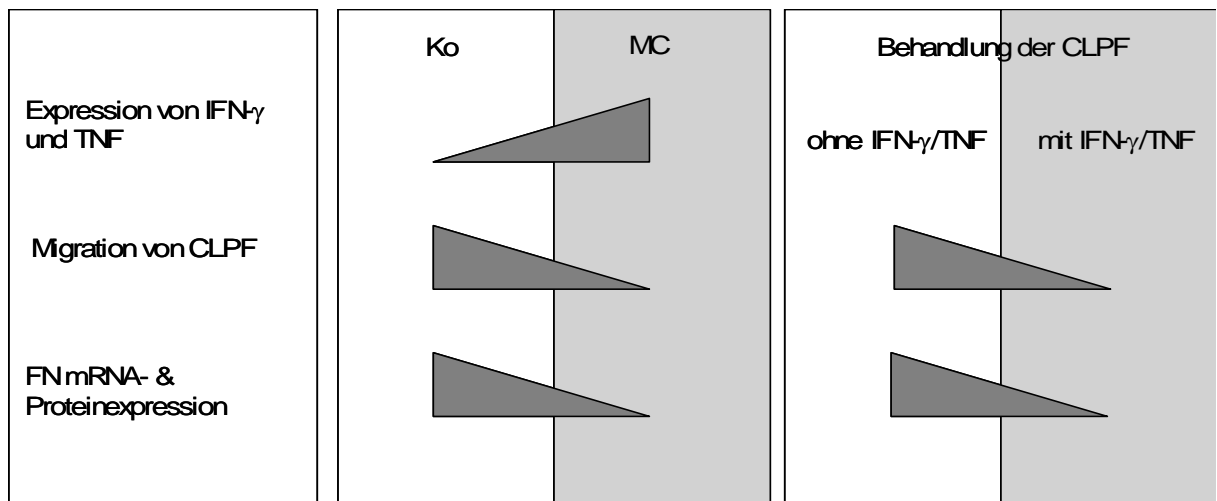


Abbildung 6-3: Übersicht über IFN- $\gamma$ - und TNF-, FN-Expression und CLPF-Migration *in vivo* verglichen mit den *in vitro* Beobachtungen.

### 6.3 TGF- $\beta$ 1 stimuliert die FN-Expression bei Kurz- und Langzeitinkubation

Die Myofibroblastendifferenzierung und -aktivierung durch TGF- $\beta$ 1 sind kritische Ereignisse in der Gewebereparatur und in der Pathogenese humaner fibrotischer Erkrankungen. Myofibroblasten und TGF- $\beta$ 1 sind Schlüsselemente für die Bildung der Zugkraft assoziiert mit Wundkontraktion und pathologischen Kontrakturen wie bei der Entwicklung von stenotischem Gewebe. Myofibroblasten sind charakterisiert durch das Vorhandensein von  $\alpha$ -smooth muscle actin-beeinhaltende Stressfasern, Vinculin-enthaltende Fibronexus Adhäsionskomplexe und FN-Fibrillen, die ED-A positives FN enthalten <sup>214</sup>. TGF- $\beta$ 1 fördert die Kontraktion von Kollagengelen mit CLPF durch die Differenzierung in Myofibroblasten <sup>215</sup>. Außerdem induziert es einen dosisabhängigen Anstieg der Zugkraftbildung und einem begleiteten Expressionsanstieg von  $\alpha$ -Aktin <sup>214</sup>. TGF- $\beta$ 1 stimuliert die Expression von  $\alpha$ -smooth muscle actin in CLPF und damit deren Differenzierung in Myofibroblasten begleitet von einem verringerten Migrationspotential.

In dieser hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$ 1 die Expression von FN und den Spleißformen moduliert und daher wahrscheinlich Auswirkungen auf die Migrationsfähigkeit hat. Kontroll-CLPF, die für 3 Tage mit serumfreien Medium und 20 pg/ml TGF- $\beta$ 1 inkubiert wurden, zeigten einen leichten aber signifikanten Anstieg der FN- und Spleißformenexpression auf mRNA- und Proteinebene. Die Integrinexpression wurde durch TGF- $\beta$ 1-Behandlung nicht beeinflusst.

Um eine  $\alpha$ -Aktin Expression und somit eine Migration, die von  $\alpha$ -Aktin abhängig ist, zu induzieren waren für weitere Versuche höhere TGF- $\beta$  Dosen notwendig als 20

pg/ml wie sie in den Studien von Simmons *et al.* und Vaughan *et al.*<sup>96, 214</sup> verwendet wurden. Die Notwendigkeit höherer Konzentrationen könnte ein Effekt sein, der vom Alter der Zellen oder von der untersuchten Erkrankung abhängig ist, denn Simmons *et al.* verwendeten für ihre Untersuchungen CCD-18Co Fibroblasten, die aus dem Kolon eines 2,5 Monate alten Kindes isoliert wurden, während in dieser Studie intestinale Fibroblasten aus Erwachsenen isoliert wurden. Vaughan *et al.* nutzten Myofibroblasten, die durch Kollagenasedigestion aus Palmar Aponeurose-Explantaten von Patienten mit Dupuytrenscher Kontraktur gewonnen wurden<sup>214</sup>. Es scheint, dass Fibroblasten, die aus Palmar Aponeurosen erhalten wurden, für die Migration sensibler auf TGF- $\beta$ 1 reagieren als intestinale CLPF.

In dieser Arbeit konnte durch Zugabe von 10 ng/ml und 50 ng/ml TGF- $\beta$ 1 eine dosisabhängige Expressionszunahme an FN, FN ED-A und FN ED-B auf mRNA- und auf Proteinebene beobachtet werden. Nach 2 Tagen Inkubationszeit stieg die mRNA-Expression von FN und den Spleißvarianten FN ED-A und FN ED-B signifikant an. Ein Expressionsanstieg durch TGF- $\beta$ 1, der aber um durchschnittlich 75 % niedriger verlief, wurde nach einer 6 tägigen Stimulation erzielt. Dahingegen konnte auf Proteinebene nach 6 Tagen eine höhere Expression des Gesamt-FN und jeder FN Spleißvariante hinsichtlich der unstimulierten Kontrolle als nach 2 Tagen beobachtet werden, während sich die Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 Expression kaum änderte. Der durch Kurz- und Langzeitinkubation induzierte biphasige Effekt von TGF- $\beta$ 1, der auf mRNA-Ebene mit FN bewiesen werden konnte, wurde bereits von unserer und anderen Gruppen auf Migrationsebene beobachtet. So zeigten Cordeiro *et al.*, dass die Isoformen TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 und - $\beta$ 3 einen biphasigen Effekt auf die Migration von humanen Fibroblasten aus der Tenon Kapsel hinsichtlich der Zeit und der Wundheilung hatten<sup>216</sup>. Außerdem konnte TGF- $\beta$ 2 ein biphasiger Effekt auf die

Differenzierung von Osteoklasten der fötalen „Schweizer Albino-Maus“ zugeschrieben werden <sup>217</sup>.

Es waren jedoch nach 6 Tagen TGF- $\beta$ 1-Stimulation höhere FN-Proteinmengen nachzuweisen als nach einer Kurzzeitinkubation von 2 Tagen. Das könnte mit der zeitlich versetzten Translation der mRNA-Transkripte und der Halbwertszeit der FN Proteine zusammenhängen.

TGF- $\beta$ 1 wird erhöht in Myofibroblasten an fibrotischen Stellen in experimenteller Enterocolitis und bei MC produziert <sup>96</sup>. Bei einer MC-Erkrankung betrifft die erhöhte TGF- $\beta$ 1 Expression alle Wandschichten, während bei CU der Expressionsanstieg auf die *Lamina propria* und die *Submukosa* beschränkt ist. Die Verteilung der TGF- $\beta$ 1 Expression stimmt mit der Verteilung der entzündlichen Infiltrate überein. Der Anstieg des Kollagen Typ III:I Ratios bei MC und CU deckt sich ebenfalls mit den entzündlichen Infiltraten <sup>218</sup>. Außerdem sind TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3 und deren Rezeptoren erhöht in stenosierten MC Gewebeproben zu finden <sup>101</sup>.

Gegensätzliche migrationsmodulierende Effekte wurden in der Literatur beschrieben. Ellis *et al.* berichteten über ein diverses Muster von mitogenen Antworten zu den drei TGF- $\beta$  Isoformen. Die Migration von subkonfluenten Fibroblasten in ein 3D Kollagengel wurde durch alle drei TGF- $\beta$  Isoformen inhibiert, während die Migration von konfluenten Zellen durch TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 nicht beeinflusst, aber durch TGF- $\beta$ 3 stimuliert wurde <sup>95</sup>. Postlethwaite *et al.* konnten zeigen, dass TGF- $\beta$ 1 ein potenter Chemoattraktant in der modifizierten Boyden Kammer für humane Hautfibroblasten ist. <sup>100</sup>. Die Migration inhibierenden Effekte von TGF- $\beta$ 1 auf die Fibroblastenmigration in ein 3D Kollagengel stehen im Gegensatz zu Berichten, die TGF- $\beta$ 1 als Stimulanz der Migration von humanen Hautfibroblasten in der modifizierten Boyden Kammer beschreiben <sup>94</sup>.

Vor kurzem untersuchte unsere Gruppe den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die CLPF-Migration in der modifizierten Boyden Kammer nach einer 6 h Inkubation. Es zeigte sich eine signifikante Migrationsinduktion durch TGF- $\beta$ 1<sup>190</sup>, während eine Langzeitinkubation für 6 Tage mit TGF- $\beta$ 1 eine kennzeichnende Reduktion der Migration induzierte. Zudem zeigte sich, dass die Migration der für 6 d mit TGF- $\beta$ 1 vorbehandelten Kontroll-CLPF selbst mit 4 stündiger PDGF-AB-Inkubation nicht restituiert werden konnte, während die Migrationsrate der Zellen, die über den gleichen Zeitraum mit serumfreien Medium inkubiert wurden, im Gegensatz dazu PDGF-Konzentrationsabhängig stieg. Gleichzeitig zeigten die vorbehandelten Kontroll-CLPF eine erhöhte Expression der mRNA von FN und den Spleißformen FN ED-A und FN ED-B als CLPF, die nicht mit TGF- $\beta$ 1 vorinkubiert wurden. Die dosisabhängige Steigerung der Zellmigration der nicht vorinkubierten Kontroll-CLPF war auf mRNA-Ebene hinsichtlich des migrationinduzierenden Faktors FN nur leicht zu erkennen. Eine Steigerung des mRNA Expressionslevels abhängig von der Dosis an PDGF-AB zeigte sich, wobei 10 ng/ml PDGF-AB zur höchsten Stimulation der mRNA-Expression der FN Spleißvarianten führten. Bei der TGF- $\beta$ 1-Vorbehandlung war eine stärkere aber anders verlaufende mRNA-Expressionssteigerung von FN, FN ED-A und FN ED-B zu beobachten. So erzielten 20 ng/ml PDGF-AB bzw. keine Zugabe des Wachstumsfaktors zum konditionierten Medium im Verwundungsassay die höheren mRNA-Expressionsunterschiede. Im Western Blot konnte demonstriert werden, dass mit TGF- $\beta$ 1 vorinkubierte Kontroll-CLPF-Monolayer, der mit einem Kamm verwundet und mit PDGF-AB im konditionierten Medium stimuliert wurde, nach 6 Tagen mehr Proteinmengen an FN, FN ED-A und FN ED-B exprimierten als TGF- $\beta$ 1 unbehandelte Kontrollen.

Die Integrinexpression, über die die Migration der Fibroblasten vermittelt wird, wurde durch eine TGF- $\beta$ 1-Stimulation kaum beeinflusst. Die Expression der Integrin-Untereinheit  $\alpha$ 5 stieg durch Inkubation mit TGF- $\beta$ 1 zwar dosisabhängig an, doch waren die Unterschiede nicht signifikant. Nach einer 6 Tagesinkubation zeigte sich zudem eine geringere Proteinexpression als nach 2 Tagen. Die Proteinlevel der Integrin-Untereinheit  $\beta$ 1 stiegen ebenfalls dosisabhängig. Nach 6 Tagen war außerdem eine stärkere Expression des Protein zu beobachten als nach 2 Tagen. Da vor allem Integrin  $\beta$ 1 über Talin und Paxillin mit FAK interagiert und somit die Migration vermittelt (siehe 1.7), müsste eigentlich eine stärkere Migration beobachtet werden. Da durch Langzeit-Inkubation mit TGF- $\beta$ 1 eine Differenzierung der Fibroblasten in migrationsverminderte Myofibroblasten erfolgte (Abbildung 6-4), haben wahrscheinlich leicht erhöhte Mengen an Rezeptoren (Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1) keinen Effekt.

Die Myofibroblastendifferenzierung durch TGF- $\beta$ 1 ist abhängig von Zelladhäsion und Integrin-*signaling* über FAK. TGF- $\beta$ 1 induziert Tyrosinphosphorylierung der Autophosphorylierungsstelle Tyr-397 der FAK, ein Effekt, der von Zelladhäsion abhängig ist und relativ zeitverzögert zur frühen Smad Signalkaskade verläuft. Pharmakologische Inhibition der FAK oder die Expression der Kinase-defizienten FAK, bei der die Autophosphorylierungsstelle Tyr-397 mit einem Phe substituiert wurde, inhibierte die TGF- $\beta$ 1-induzierte  *$\alpha$ -smooth muscle actin* Expression und Stressfaserformation<sup>219</sup>.

Aber FAK ist nicht nur in Adhäsion sondern auch in Zellmigrationsprozesse involviert. FAK-defiziente Fibroblasten besitzen Defekte in der Zellmigration und eine erhöhte Anzahl der Zellsubstrat-Kontaktstellen<sup>220</sup>. Das reduzierte Migrationsverhalten der

MC- und CU-CLPF wird begleitet von einer Reduktion von FAK und einer FAK Phosphorylierung<sup>128</sup>.

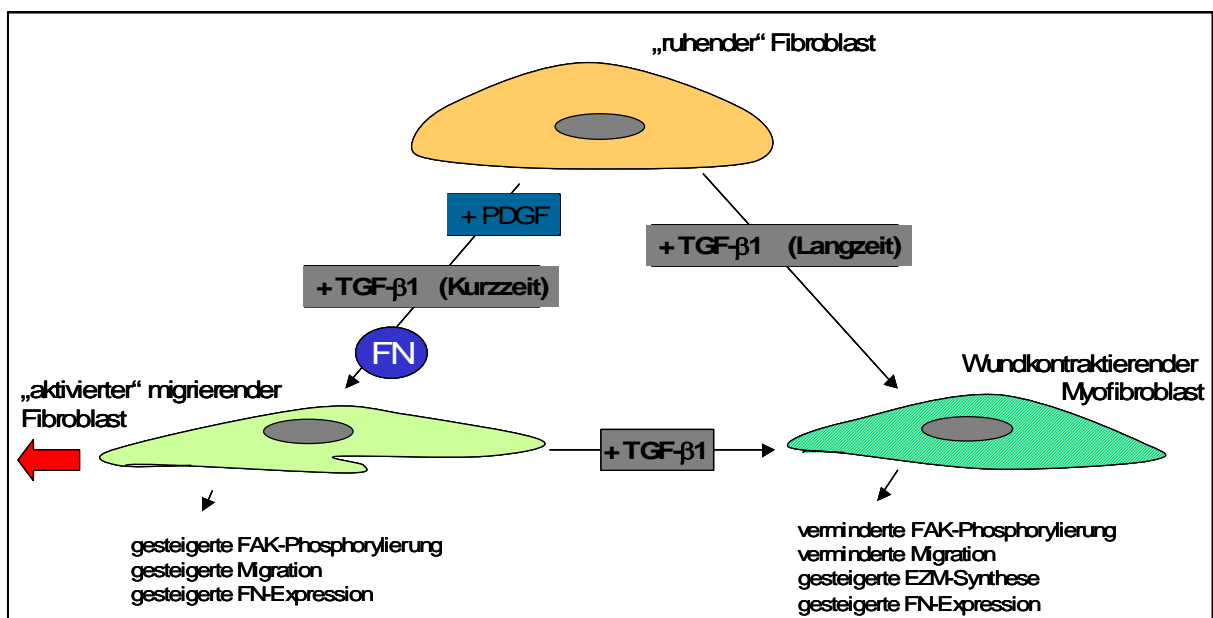
Eine Langzeitinkubation der intestinalen Fibroblasten mit TGF- $\beta$ 1 induzierte eine Differenzierung der Zellen in Myofibroblasten mit einer gesteigerten  $\alpha$ -Aktinexpression, einem verminderten Migrationspotential und korrelierender FAK-Autophosphorylierung. Im Gegensatz dazu induzierte TGF- $\beta$ 1 bei einer kurzweiligen Inkubation eine dosisabhängige gesteigerte Zellmigration sowie eine gesteigerte FAK-Phosphorylierung ohne Induktion der  $\alpha$ -Aktinexpression.

Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass nach der Verwundung TGF- $\beta$ 1 von einer Vielzahl an verschiedenen Zellentypen sezerniert werden und daraufhin mesenchymale Bindegewebszellen wie CLPF entlang des TGF- $\beta$ 1 Gradienten in die Wunde migrieren (Abbildung 6-5). Eine Langzeitinkubation mit TGF- $\beta$ 1 in der Wunde führt zur Differenzierung der Zellen in Myofibroblasten. Durch Wundkontraktion und Bildung von EZM-Proteinen beteiligen sich die Myofibroblasten an der Wundheilung<sup>221</sup>. Der lokale Anstieg der Anzahl der Zellen, die zudem ein vermindertes Apoptoseverhalten aufweisen, und die gesteigerte Deposition der EZM wie FN führen schließlich zur Fibrose. Wahrscheinlich führt das von den eingewanderten CLPF während der Migrationsinduktion produzierte und (auch in der Wunde zur Wundkontraktion) sezernierte FN zu einer Verstärkung des Migrationsgradienten, zusätzlich zum bestehenden TGF- $\beta$ 1-Gradienten, der durch Sekretion von den differenzierten Myofibroblasten verstärkt wird<sup>96</sup>. Das würde bedeuten, dass CLPF, die kurzzeitig mit TGF- $\beta$ 1 in Kontakt treten, eine gesteigerte Migration aufgrund erhöhter FAK-Phosphorylierung und FN Expression aufweisen. Die FAK-Phosphorylierung und die Migration ist bei den Zellen, die mit TGF- $\beta$ 1 längerfristig

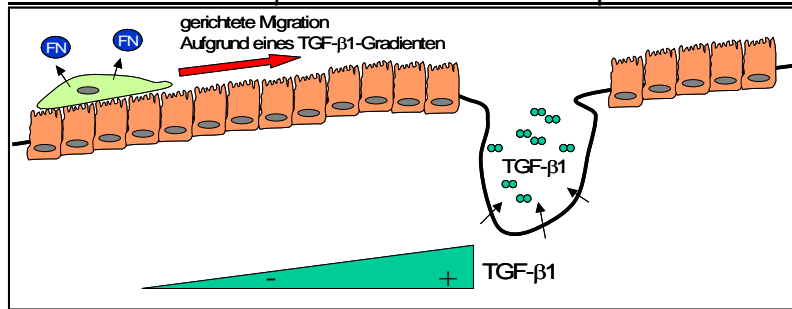


inkubiert wurden, reduziert, da TGF- $\beta$ 1 eine Differenzierung in migrationsverminderte und EZM (u. a. auch FN)-bildende Myofibroblasten bewirkt (Abbildung 6-4).

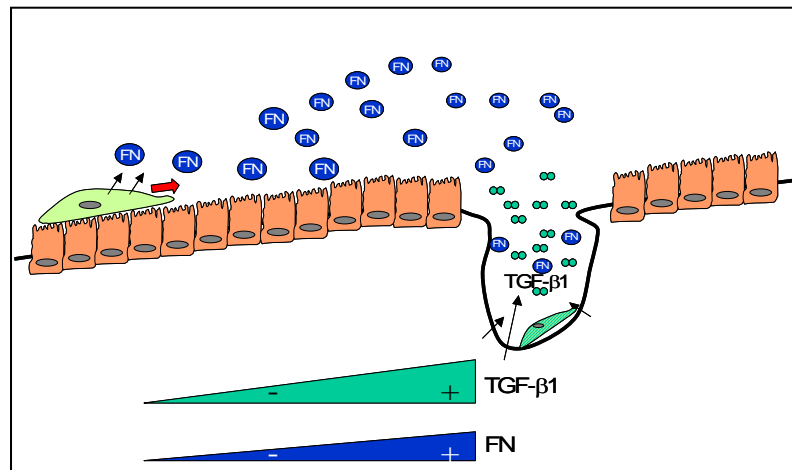
Eine Inkubation mit PDGF steigert in CLPF die FN-Expression und führt in Abhängigkeit von FN zu einer Induktion der Migration. Durch TGF- $\beta$ 1 differenzierte Myofibroblasten produzieren unter Einfluss von PDGF mehr FN Spleißformen als Komponente der EZM für die Wundkontraktion. Der Wachstumsfaktor steigert zudem die Synthese von anderen EZM-Bestandteilen wie Kollagen Typ I, II und III. So konnten Hanaoka *et al.* zeigen, dass Zellen aus dem Temporomandibulär-Gelenk durch PDGF-BB eine signifikant höhere Gesamt-Kollagen Synthese aufwiesen <sup>222</sup>. Außerdem zeigte sich in diesen Zellen durch PDGF-Stimulation eine höhere Zellproliferation und eine erhöhte Kollagen Typ I und II mRNA-Expression. In humanen periodontalen Fibroblasten <sup>223</sup> und in *smooth muscle cells* <sup>224</sup> stieg die EZM-Synthese ebenfalls durch die Inkubation mit dem Wachstumsfaktor.



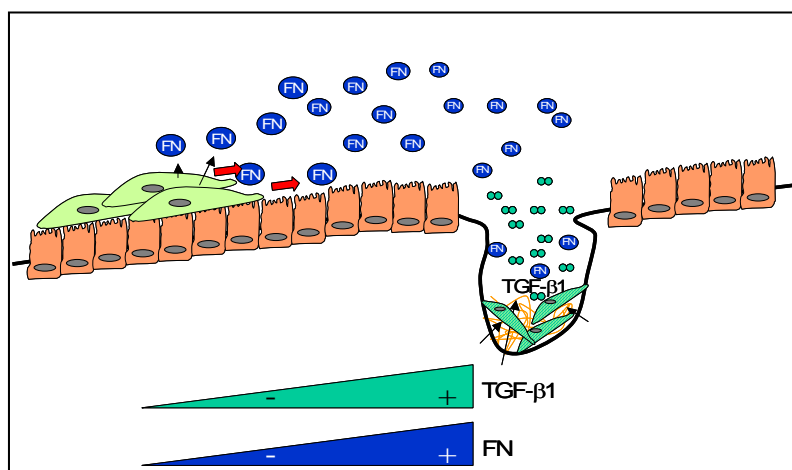
**Abbildung 6-4: Modell zur Differenzierung eines ruhenden Fibroblasts in einen migrierenden Fibroblast oder Myofibroblast.** Die Stimulation mit PDGF und/oder die kurzweilige Inkubation mit TGF- $\beta$ 1 führt in Gegenwart von FN zur Migrationsinduktion des Fibroblasts. Eine Langzeitinkubation mit TGF- $\beta$ 1 resultiert in einer Differenzierung des ruhenden oder migrierenden Fibroblasts in einen Myofibroblasten.



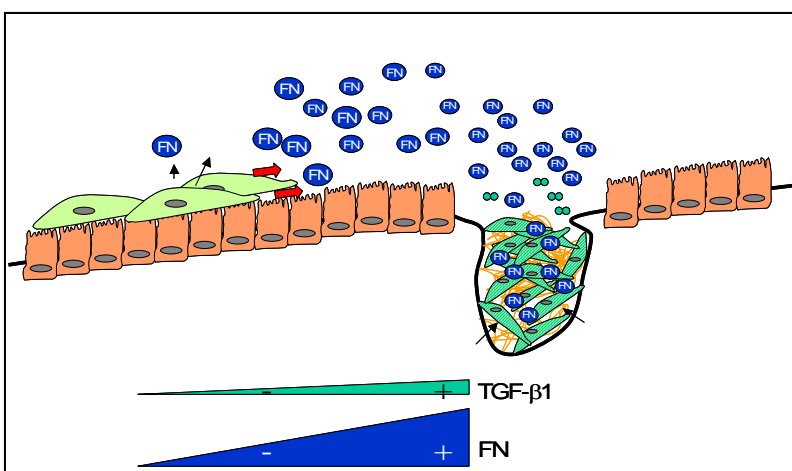
Gerichtete Migration  
aufgrund eines TGF- $\beta$ 1-Gradienten  
→ gesteigerte Expression von FN-mRNA & FN-Protein  
→ Sekretion von FN



Differenzierung der CLPF in Myofibroblasten durch TGF- $\beta$ 1 → weiterhin hohe Expression der FN-mRNA & -Proteine → hohe Sekretion von FN → gerichtete Migration aufgrund des TGF- $\beta$ 1- und des FN-Gradienten  
→ weitere Expression und Sekretion von FN durch migrierende Fibroblasten



gerichtete Migration von Fibroblasten zur Wunde aufgrund des TGF- $\beta$ 1- und des FN-Gradienten → gesteigerte FN-Expression und -Sekretion  
Differenzierung der CLPF in Myofibroblasten durch TGF- $\beta$ 1 → keine Migration mehr → Bildung von EZM (u.a. auch FN)  
→ weitere gerichtete Migration von Fibroblasten



Wundschluss durch eingewanderte und in Myofibroblasten differenzierte Fibroblasten sowie gebildete EZM → dennoch Bestehen des FN-Gradienten  
→ weiterhin gerichtete Migration von Fibroblasten und Bildung/Sekretion von FN  
→ **Stenosebildung**

Abbildung 6-5: Modell der durch TGF- $\beta$ 1 gerichteten CLPF-Migration und induzierten Stenosebildung

## 7. Zusammenfassung

Die Migration von Colon Lamina Propria Fibroblasten und die Wundkontraktion spielen bei der Wundheilung und im Verlauf der Entzündung, Strikturen- und Fistelbildung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine wesentliche Rolle. Es ist aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bekannt, dass die Fibroblasten aus der Mukosa von gesunden Kontrollen und Patienten mit unterschiedlichen Subtypen von Morbus Crohn unterschiedlich stark migrieren. Fibroblasten aus einfach entzündeter Mukosa von Patienten mit Morbus Crohn migrieren weniger als Fibroblasten, die aus der gesunden Mukosa von Kontrollpatienten isoliert wurden. Fibroblasten aus Stenosearealen weisen ein höheres und Fibroblasten aus Fistelgewebe von Morbus Crohn-Patienten ein vermindertes Migrationspotential verglichen mit einfach entzündeten Morbus Crohn-Fibroblasten auf. Fibronectin und im Besonderen die Spleißvariante Fibronectin ED-A sind als die induzierenden Faktoren der Fibroblastenmigration bekannt.

Des Weiteren ist durch vorangegangene Migrationsassays mit Kontrollfibroblasten, die für 3 Tage mit IFN- $\gamma$  und TNF inkubiert wurden, eine dosisabhängige signifikante Hemmung der Migration beobachtet worden.

Bei einer Langzeitinkubation von 6 Tagen mit TGF- $\beta$ 1 zeigen intestinale Kontrollfibroblasten ein reduziertes Migrationspotential, während eine 6 stündige Inkubation der Kontrollfibroblasten mit TGF- $\beta$ 1 zu einer dosisabhängigen Steigerung der Zellmigration führt. Wird ein Kontrollfibroblasten-*Monolayer* nach einer 6 tägigen Inkubation mit TGF- $\beta$ 1 mit einem Kamm verwundet und anschließend für 4 Stunden mit dem Wachstumsfaktor PDGF inkubiert, weisen die vorstimulierten Zellen neben der verminderten Migration auch eine reduzierte FAK-Autophosphorylierung auf,

während die Zellen ohne Vorinkubation eine mit erhöhter FAK-Phosphorylierung verbundene Migrationserhöhung zeigen.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die Zusammenhänge zwischen der Migration von Fibroblasten und der Fibronectin Spleißformenexpression zu beleuchten. In Fibroblasten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen korrelierte das Migrationsverhalten mit der Fibronectinexpression. Durch Hemmung bzw. Stimulation der Zellmigration mit den Zytokinen IFN- $\gamma$  und TNF bzw. den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 konnte eine jeweilige verminderte bzw. gesteigerte Fibronectinexpression erzielt werden. Auch der biphasige Effekt von TGF- $\beta$ 1 konnte auf Fibronectin mRNA-Ebene gezeigt werden. Mit TGF- $\beta$ 1 vorstimulierte und dadurch zu Myofibroblasten differenzierte Fibroblasten zeigten nach Verwundung und Inkubation mit PDGF eine gesteigerte Fibronectinexpression, die auf eine gesteigerte Synthese der Extrazellulärmatrix zurückzuführen ist, da eine erhöhte Migration aufgrund der verminderten FAK-Autophosphorylierung nicht möglich war. Nicht vorinkubierte Zellen wiesen eine mit der bekannten Migrationserhöhung korrelierende gesteigerte Fibronectinexpression und FAK-Phosphorylierung auf.

Weitere Studien zur Synthese der Extrazellulärmatrix, die indirekt durch TGF- $\beta$ 1 und PDGF induziert wird, könnten zusätzliche Erkenntnisse hinsichtlich der Bildung von Stenosen bei Morbus Crohn geben.

## 8. Ausblick

Viele Versuche wurden entwickelt, um die FN Expression zu modulieren. Die vielversprechendsten Modulatoren sind synthetische Peptide mit bekannter Funktion abgeleitet von der Sequenz innerhalb des FN Moleküls. Um die Anheftung von Lymphozyten in rheumatoiden Arthritisgeweben zu blockieren, wurden CS-1 Peptide abgeleitet von der IIIcS-Sequenz verwendet<sup>225</sup>. Davies *et al.* zeigten, dass zyklische RGD Peptide die Zellmigration und Tumormetastase *in vivo* modulieren konnten<sup>226</sup>. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass Peptide der ED-A Sequenz auf ihre Fähigkeit, die Migration von MC-CLPF zu modulieren, getestet werden sollten. Bei Patienten mit MC Stenose könnte die Migration von CLPF durch Blockieren der ED-A Sequenz blockiert werden. Künftig müssten weitere Studien folgen, um diese Strategie zur Prävention der Stenosebildung zu überprüfen.

Des Weiteren könnte untersucht werden, inwiefern eine „Dauerinkubation“ mit TGF- $\beta$ 1 - neben der bewirkten Differenzierung der CLPF in Myofibroblasten und dadurch verminderten Migration, FAK-Phosphorylierung und einer gesteigerten EZM-Synthese wie Kollagen und FN - und der zusätzlichen Stimulation mit PDGF die Synthese der Extrazellulärmatrix induziert wird. So würden zusätzliche Erkenntnisse hinsichtlich der Bildung von Stenosen bei Morbus Crohn gegeben werden, die aus der Verstärkung der Matrixsynthese und der CLPF-Migration resultiert.

## 9. Referenzen

1. Graham MF. Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease - an update. *Inflamm Bowel Dis* 1995;1:220-227.
2. Klein I, Reif S, Farbstein H, Halak A, Gilat T. Preillness non dietary factors and habits in inflammatory bowel disease. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998;30:247-251.
3. Neurath MF, Schurmann G. [Immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases]. *Chirurg* 2000;71:30-40.
4. Russel MG, Volovics A, Schoon EJ, van Wijlick EH, Logan RF, Shivananda S, Stockbrugger RW. Inflammatory bowel disease: is there any relation between smoking status and disease presentation? European Collaborative IBD Study Group. *Inflamm Bowel Dis* 1998;4:182-186.
5. Binder V, Orholm M. Familial occurrence and inheritance studies in inflammatory bowel disease. *Neth J Med* 1996;48:53-56.
6. Schreiber S, Hanpe J, Nikolaus S, Foelsch UR. Review article: exploration of the genetic aetiology of inflammatory bowel disease--implications for diagnosis and therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20 Suppl 4:1-8.
7. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
8. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-606.
9. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 2001;276:4812-4818.
10. Inohara N, Koseki T, Lin J, del PL, Lucas PC, Chen FF, Ogura Y, Nunez G. An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J Biol Chem* 2000;275:27823-27831.
11. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 1997;388:548-554.
12. Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T, Chen FF, Foster SJ, Duerr RH, Brant SR, Cho JH, Nunez G. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* 2003;124:140-146.

13. Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nunez G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 2001;276:2551-2554.
14. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nunez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003;278:5509-5512.
15. Hugot JP, Zouali H, Lesage S. Lessons to be learned from the NOD2 gene in Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:593-597.
16. Inohara, Chamaillard, McDonald C, Nunez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 2005;74:355-383.
17. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:44-54.
18. Arnott ID, Kingstone K, Ghosh S. Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1163-1169.
19. Irvine EJ, Marshall JK. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology* 2000;119:1740-1744.
20. Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W, Waldhoer T, Lochs H. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* 1993;341:1437-1439.
21. Lorenz R, Olbert P, Born P. Factor XIII in chronic inflammatory bowel diseases. *Semin Thromb Hemost* 1996;22:451-455.
22. Hartz RS, Poticha SM, Shields TW. Healing of the perineal wound. *Arch Surg* 1980;115:471-474.
23. McGarity WC, Mallory C, Walker J. Perineal wound healing after abdominoperineal resection. *Am Surg* 1976;42:206-211.
24. McLeod R, Cohen Z, Langer B, Taylor B. Primary perineal wound closure following excision of the rectum. *Can J Surg* 1983;26:122-124.
25. Oakley JR, Fazio VW, Jagelman DG, Lavery IC, Weakley FL, Easley K. Management of the perineal wound after rectal excision for ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum* 1985;28:885-888.
26. Tompkins RG, Warshaw AL. Improved management of the perineal wound after proctectomy. *Ann Surg* 1985;202:760-765.
27. Waits JO, Dozois RR, Kelly KA. Primary closure and continuous irrigation of the perineal wound after proctectomy. *Mayo Clin Proc* 1982;57:185-188.

28. Hughes LE. Surgical pathology and management of anorectal Crohn's disease. *J R Soc Med* 1978;71:644-651.
29. Centocor. Long-term data from ACCENT II Trial with Remicade(R) (infliximab) in maintaining fistula closures in Crohn's patients. 2006.
30. Louis E, Michel V, Hugot JP, Reenaers C, Fontaine F, Delforge M, El YF, Colombel JF, Belaiche J. Early development of stricturing or penetrating pattern in Crohn's disease is influenced by disease location, number of flares, and smoking but not by NOD2/CARD15 genotype. *Gut* 2003;52:552-557.
31. varez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M, Tassies D, Plaza S, Delgado S, Lacy AM, Pique JM, Yague J, Panes J. Crohn's disease patients carrying Nod2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. *Ann Surg* 2005;242:693-700.
32. Dale PD, Sherratt JA, Maini PK. Role of fibroblast migration in collagen fiber formation during fetal and adult dermal wound healing. *Bull Math Biol* 1997;59:1077-1100.
33. Goris RJH. Die Wundheilung: Ein kontrollierter Entzündungsprozess. In *Aspekte im Gespräch - Extracta aus Wissenschaft und Klinik* 7, Biotest Pharma GmbH 1997;S. 8-16.
34. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molekularbiologie der Zelle: Viele Zellen strecken von ihrem Leitsaum dynamische Actin-haltige Mikrospikes und Lamellipodien aus. Weinheim: VCH, 1997:977-978.
35. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molekularbiologie der Zelle: Der Leisaum beweglicher Zellen setzt die Polymerisation in Gang. Weinheim: VCH, 1997:978-979.
36. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molekularbiologie der Zelle: Fokalkontakte ermöglichen es den Actin-Filamenten, an der Unterlage zu ziehen. Weinheim: VCH, 1997:992-994.
37. Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2000;2:249-256.
38. Abedi H, Dawes KE, Zachary I. Differential effects of platelet-derived growth factor BB on p125 focal adhesion kinase and paxillin tyrosine phosphorylation and on cell migration in rabbit aortic vascular smooth muscle cells and Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1995;270:11367-11376.
39. Carloni V, Romanelli RG, Pinzani M, Laffi G, Gentilini P. Focal adhesion kinase and phospholipase C gamma involvement in adhesion and migration of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1997;112:522-531.
40. Chen HC, Appeddu PA, Parsons JT, Hildebrand JD, Schaller MD, Guan JL. Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem* 1995;270:16995-16999.



41. Schaller MD, Parsons JT. Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:705-710.
42. Hildebrand JD, Schaller MD, Parsons JT. Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. *J Cell Biol* 1993;123:993-1005.
43. Liu S, Thomas SM, Woodside DG, Rose DM, Kiosses WB, Pfaff M, Ginsberg MH. Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrin-dependent biological responses. *Nature* 1999;402:676-681.
44. Tachibana K, Sato T, D'Avirro N, Morimoto C. Direct association of pp125FAK with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp125FAK. *J Exp Med* 1995;182:1089-1099.
45. Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, Yamada KM. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol* 1996;135:1633-1642.
46. Gailit J, Clarke C, Newman D, Tonnesen MG, Mosesson MW, Clark RA. Human fibroblasts bind directly to fibrinogen at RGD sites through integrin alpha(v)beta3. *Exp Cell Res* 1997;232:118-126.
47. Schor SL, Ellis I, Dolman C, Banyard J, Humphries MJ, Mosher DF, Grey AM, Mould AP, Sottile J, Schor AM. Substratum-dependent stimulation of fibroblast migration by the gelatin-binding domain of fibronectin. *J Cell Sci* 1996;109 ( Pt 10):2581-2590.
48. Xu J, Clark RA. Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. *J Cell Biol* 1996;132:239-249.
49. Naito M, Hayashi T, Funaki C, Kuzuya M, Asai K, Yamada K, Kuzuya F. Vitronectin-induced haptotaxis of vascular smooth muscle cells in vitro. *Exp Cell Res* 1991;194:154-156.
50. Nelson PR, Yamamura S, Kent KC. Extracellular matrix proteins are potent agonists of human smooth muscle cell migration. *J Vasc Surg* 1996;24:25-32.
51. Hynes RO. *Fibronectins*. Springer-Verlag, New York, 1990.
52. Hynes RO. Fibronectins: a family of complex and versatile adhesive glycoproteins derived from a single gene. *Harvey Lect* 1985;81:133-152.
53. Hynes R. Molecular biology of fibronectin. *Annu Rev Cell Biol* 1985;1:67-90.
54. Schwarzbauer JE. Fibronectin: from gene to protein. *Curr Opin Cell Biol* 1991;3:786-791.
55. Vartio T, Laitinen L, Narvanen O, Cutolo M, Thornell LE, Zardi L, Virtanen I. Differential expression of the ED sequence-containing form of cellular fibronectin in embryonic and adult human tissues. *J Cell Sci* 1987;88 ( Pt 4):419-430.

56. Zardi L, Carnemolla B, Siri A, Petersen TE, Paoletta G, Sebastio G, Baralle FE. Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon. *EMBO J* 1987;6:2337-2342.
57. Owens RJ, Kornblihtt AR, Baralle FE. Fibronectin, the generation of multiple polypeptides from a single gene. *Oxf Surv Eukaryot Genes* 1986;3:141-160.
58. Schwarzbauer JE, Tamkun JW, Lemischka IR, Hynes RO. Three different fibronectin mRNAs arise by alternative splicing within the coding region. *Cell* 1983;35:421-431.
59. MacLeod JN, Burton-Wurster N, Gu DN, Lust G. Fibronectin mRNA splice variant in articular cartilage lacks bases encoding the V, III-15, and I-10 protein segments. *J Biol Chem* 1996;271:18954-18960.
60. Kornblihtt AR, Umezawa K, Vibe-Pedersen K, Baralle FE. Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO J* 1985;4:1755-1759.
61. Sekiguchi K, Klos AM, Kurachi K, Yoshitake S, Hakomori S. Human liver fibronectin complementary DNAs: identification of two different messenger RNAs possibly encoding the alpha and beta subunits of plasma fibronectin. *Biochemistry* 1986;25:4936-4941.
62. French-Constant C, Van De WL, Dvorak HF, Hynes RO. Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *J Cell Biol* 1989;109:903-914.
63. Barnes JL, Hastings RR, De la Garza MA. Sequential expression of cellular fibronectin by platelets, macrophages, and mesangial cells in proliferative glomerulonephritis. *Am J Pathol* 1994;145:585-597.
64. Jarnagin WR, Rockey DC, Koteliansky VE, Wang SS, Bissell DM. Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol* 1994;127:2037-2048.
65. Kuhn C, III, Boldt J, King TE, Jr., Crouch E, Vartio T, McDonald JA. An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:1693-1703.
66. Coito AJ, Brown LF, Peters JH, Kupiec-Weglinski JW, Van De WL. Expression of fibronectin splicing variants in organ transplantation: a differential pattern between rat cardiac allografts and isografts. *Am J Pathol* 1997;150:1757-1772.
67. Dubin D, Peters JH, Brown LF, Logan B, Kent KC, Berse B, Berven S, Cercek B, Sharifi BG, Pratt RE, . Balloon catheterization induced arterial expression of embryonic fibronectins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1958-1967.

68. Takasaki I, Chobanian AV, Mamuya WS, Brecher P. Hypertension induces alternatively spliced forms of fibronectin in rat aorta. *Hypertension* 1992;20:20-25.
69. Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, Nicolo G, Kaczmarek J, Querze G, Zardi L. The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis. *Int J Cancer* 1994;59:612-618.
70. Manabe R, Oh-e N, Sekiguchi K. Alternatively spliced EDA segment regulates fibronectin-dependent cell cycle progression and mitogenic signal transduction. *J Biol Chem* 1999;274:5919-5924.
71. Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, Gabbiani G. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biol* 1998;142:873-881.
72. Manabe R, Ohe N, Maeda T, Fukuda T, Sekiguchi K. Modulation of cell-adhesive activity of fibronectin by the alternatively spliced EDA segment. *J Cell Biol* 1997;139:295-307.
73. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF, III. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001;276:10229-10233.
74. Elices MJ, Tsai V, Strahl D, Goel AS, Tollefson V, Arrhenius T, Wayner EA, Gaeta FC, Fikes JD, Firestein GS. Expression and functional significance of alternatively spliced CS1 fibronectin in rheumatoid arthritis microvasculature. *J Clin Invest* 1994;93:405-416.
75. Humphries MJ, Sheridan J, Mould AP, Newham P. Mechanisms of VCAM-1 and fibronectin binding to integrin alpha 4 beta 1: implications for integrin function and rational drug design. *Ciba Found Symp* 1995;189:177-191.
76. Komoriya A, Green LJ, Mervic M, Yamada SS, Yamada KM, Humphries MJ. The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *J Biol Chem* 1991;266:15075-15079.
77. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11-25.
78. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 1984;309:30-33.
79. Goke M, Zuk A, Podolsky DK. Regulation und function of extracellular matrix intestinal epithelial restitution in vitro. *Am J Physiol* 1996;271 (5 Pt 1):G729-G740.
80. Johansson S, Svineng G, Wennerberg K, Armulik A, Lohikangas L. Fibronectin-integrin interactions. *Front Biosci* 1997;2:d126-d146.

81. Yue BY. The extracellular matrix and its modulation in the trabecular meshwork. *Surv Ophthalmol* 1996;40:379-390.
82. Dignass AU, Sturm A. Peptide growth factors in the intestine. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:763-770.
83. Chowdhury A, Fukuda R, Fukumoto S. Growth factor mRNA expression in normal colorectal mucosa and in uninvolved mucosa from ulcerative colitis patients. *J Gastroenterol* 1996;31:353-360.
84. Grimm MC, Elsbury SK, Pavli P, Doe WF. Enhanced expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 in inflammatory bowel disease mucosa. *J Leukoc Biol* 1996;59:804-812.
85. Ito M, Yoshida K, Kyo E, Ayhan A, Nakayama H, Yasui W, Ito H, Tahara E. Expression of several growth factors and their receptor genes in human colon carcinomas. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1990;59:173-178.
86. Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Inflammation location, but not type, determines the increase in TGF-beta1 and IGF-1 expression and collagen deposition in IBD intestine. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:16-26.
87. Lawrence DA, Pircher R, Kryceve-Martinerie C, Jullien P. Normal embryo fibroblasts release transforming growth factors in a latent form. *J Cell Physiol* 1984;121:184-188.
88. Zimmermann EM, Li L, Hou YT, Mohapatra NK, Pucilowska JB. Insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 5 in Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G1022-G1029.
89. Kay EP, Lee MS, Seong GJ, Lee YG. TGF-beta s stimulate cell proliferation via an autocrine production of FGF-2 in corneal stromal fibroblasts. *Curr Eye Res* 1998;17:286-293.
90. Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A, Raschke B, Becker V, van Kooten C, Muller G. TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int* 2001;59:579-592.
91. Thannickal VJ, Aldweib KD, Rajan T, Fanburg BL. Upregulated expression of fibroblast growth factor (FGF) receptors by transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) mediates enhanced mitogenic responses to FGFs in cultured human lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:437-441.
92. Adelman-Grill BC, Wach F, Cully Z, Hein R, Krieg T. Chemotactic migration of normal dermal fibroblasts towards epidermal growth factor and its modulation by platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Eur J Cell Biol* 1990;51:322-326.
93. Andresen JL, Ehlers N. Chemotaxis of human keratocytes is increased by platelet-derived growth factor-BB, epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, acidic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor-beta. *Curr Eye Res* 1998;17:79-87.

94. Ellis I, Grey AM, Schor AM, Schor SL. Antagonistic effects of TGF-beta 1 and MSF on fibroblast migration and hyaluronic acid synthesis. Possible implications for dermal wound healing. *J Cell Sci* 1992;102 ( Pt 3):447-456.
95. Ellis IR, Schor SL. Differential mitogenic and biosynthetic response of fetal and adult skin fibroblasts to TGF-beta isoforms. *Cytokine* 1998;10:281-289.
96. Simmons JG, Pucilowska JB, Keku TO, Lund PK. IGF-I and TGF-beta1 have distinct effects on phenotype and proliferation of intestinal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G809-G818.
97. Shimao Y, Nabeshima K, Inoue T, Kono M. Role of fibroblasts in HGF/SF-induced cohort migration of human colorectal carcinoma cells: fibroblasts stimulate migration associated with increased fibronectin production via upregulated TGF-beta1. *Int J Cancer* 1999;82:449-458.
98. Eickelberg O, Kohler E, Reichenberger F, Bertschin S, Woodtli T, Erne P, Perruchoud AP, Roth M. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-beta1 and TGF-beta3. *Am J Physiol* 1999;276:L814-L824.
99. Wells RG. Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G845-G850.
100. Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 1987;165:251-256.
101. McKaig BC, Hughes K, Tighe PJ, Mahida YR. Differential expression of TGF-beta isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C172-C182.
102. Piek E, Ju WJ, Heyer J, Escalante-Alcalde D, Stewart CL, Weinstein M, Deng C, Kucherlapati R, Bottinger EP, Roberts AB. Functional characterization of transforming growth factor beta signaling in Smad2- and Smad3-deficient fibroblasts. *J Biol Chem* 2001;276:19945-19953.
103. Colman-Lerner A, Fischman ML, Lanuza GM, Bissell DM, Kornblihtt AR, Baranano JL. Evidence for a role of the alternatively spliced ED-I sequence of fibronectin during ovarian follicular development. *Endocrinology* 1999;140:2541-2548.
104. Burger A, Wagner C, Viedt C, Reis B, Hug F, Hansch GM. Fibronectin synthesis by human tubular epithelial cells in culture: effects of PDGF and TGF-beta on synthesis and splicing. *Kidney Int* 1998;54:407-415.
105. Viedt C, Burger A, Hansch GM. Fibronectin synthesis in tubular epithelial cells: up-regulation of the EDA splice variant by transforming growth factor beta. *Kidney Int* 1995;48:1810-1817.
106. Balza E, Borsi L, Allemanni G, Zardi L. Transforming growth factor beta regulates the levels of different fibronectin isoforms in normal human cultured fibroblasts. *FEBS Lett* 1988;228:42-44.

107. Inoue T, Nabeshima K, Shimao Y, Kono M. Hepatocyte growth Factor/Scatter factor (HGF/SF) is a regulator of fibronectin splicing in MDCK cells: comparison between the effects of HGF/SF and TGF-beta1 on fibronectin splicing at the EDA region. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;260:225-231.
108. Borsi L, Balza E, Allemanni G, Zardi L. Differential expression of the fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain in normal human fibroblast cell lines originating from different tissues. *Exp Cell Res* 1992;199:98-105.
109. Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F, Romagnani S. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 1997;150:823-832.
110. Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A, Pinnau R, Bertovich MJ, Nash GS. Increased activation of isolated intestinal lamina propria mononuclear cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1991;101:1020-1030.
111. Schreiber S. Activation of nuclear factor kappaB as a target for anti-inflammatory therapy. *Gut* 1999;44:309-310.
112. Nielsen OH, Koppen T, Rudiger N, Horn T, Eriksen J, Kirman I. Involvement of interleukin-4 and -10 in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1996;41:1786-1793.
113. Nikolaus S, Bauditz J, Gionchetti P, Witt C, Lochs H, Schreiber S. Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation. *Gut* 1998;42:470-476.
114. Hommes D, van den BB, Plasse T, Bartelsman J, Xu C, Macpherson B, Tytgat G, Peppelenbosch M, Van DS. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;122:7-14.
115. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, Knuechel R, Baeuerle PA, Scholmerich J, Gross V. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1998;115:357-369.
116. Schreiber S, Rosenstiel P, Hampe J, Nikolaus S, Groessner B, Schottelius A, Kuhbacher T, Hamling J, Folsch UR, Seegert D. Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 in human chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 2002;51:379-385.
117. Braegger CP, MacDonald TT. Immune mechanisms in chronic inflammatory bowel disease. *Ann Allergy* 1994;72:135-141.
118. Elsasser-Beile U, von Kleist S, Gerlach S, Gallati H, Monting JS. Cytokine production in whole blood cell cultures of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Lab Anal* 1994;8:447-451.

119. Funakoshi K, Sugimura K, Sasakawa T, Bannai H, Anezaki K, Ishizuka K, Yoshida K, Narisawa R, Asakura H. Study of cytokines in ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1995;30 Suppl 8:61-63.
120. Monteleone G, MacDonald TT. Manipulation of cytokines in the management of patients with inflammatory bowel disease. *Ann Med* 2000;32:552-560.
121. Murata Y, Ishiguro J, Itoh J, Munakata A, Yoshida Y. The role of inflammatory and immunoregulatory cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1995;30 Suppl 8:56-60.
122. Camoglio L, Te Velde AA, Tigges AJ, Das PK, Van Deventer SJ. Altered expression of interferon-gamma and interleukin-4 in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 1998;4:285-290.
123. Brouty-Boye D, Zetter BR. Inhibition of cell motility by interferon. *Science* 1980;208:516-518.
124. Adelman-Grill BC, Hein R, Wach F, Krieg T. Inhibition of fibroblast chemotaxis by recombinant human interferon gamma and interferon alpha. *J Cell Physiol* 1987;130:270-275.
125. Schirren CG, Scharffetter K, Hein R, Braun-Falco O, Krieg T. Tumor necrosis factor alpha induces invasiveness of human skin fibroblasts in vitro. *J Invest Dermatol* 1990;94:706-710.
126. Postlethwaite AE, Seyer JM. Stimulation of fibroblast chemotaxis by human recombinant tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and a synthetic TNF-alpha 31-68 peptide. *J Exp Med* 1990;172:1749-1756.
127. Goetze S, Xi XP, Kawano Y, Kawano H, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. TNF-alpha-induced migration of vascular smooth muscle cells is MAPK dependent. *Hypertension* 1999;33:183-189.
128. Leeb SN, Vogl D, Gunckel M, Kiessling S, Falk W, Goke M, Scholmerich J, Gelbmann CM, Rogler G. Reduced migration of fibroblasts in inflammatory bowel disease: role of inflammatory mediators and focal adhesion kinase. *Gastroenterology* 2003;125:1341-1354.
129. Kohler N, Lipton A. Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp Cell Res* 1974;87:297-301.
130. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71:1207-1210.
131. Westermarck B, Wasteson A. A platelet factor stimulating human normal glial cells. *Exp Cell Res* 1976;98:170-174.
132. Ataliotis P, Mercola M. Distribution and functions of platelet-derived growth factors and their receptors during embryogenesis. *Int Rev Cytol* 1997;172:95-127.

133. DiCorleto PE, Bowen-Pope DF. Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:1919-1923.
134. Bronzert DA, Bates SE, Sheridan JP, Lindsey R, Valverius EM, Stampfer MR, Lippman ME, Dickson RB. Transforming growth factor-beta induces platelet-derived growth factor (PDGF) messenger RNA and PDGF secretion while inhibiting growth in normal human mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol* 1990;4:981-989.
135. Deuel TF. Polypeptide growth factors: roles in normal and abnormal cell growth. *Annu Rev Cell Biol* 1987;3:443-492.
136. Heldin CH. Structural and functional studies on platelet-derived growth factor. *EMBO J* 1992;11:4251-4259.
137. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 1986;46:155-169.
138. Deuel TF, Senior RM, Huang JS, Griffin GL. Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. *J Clin Invest* 1982;69:1046-1049.
139. Deuel TF, Huang JS, Huang SS, Stroobant P, Waterfield MD. Expression of a platelet-derived growth factor-like protein in simian sarcoma virus transformed cells. *Science* 1983;221:1348-1350.
140. Doolittle RF, Hunkapiller MW, Hood LE, Devare SG, Robbins KC, Aaronson SA, Antoniades HN. Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* 1983;221:275-277.
141. Senior RM, Griffin GL, Huang JS, Walz DA, Deuel TF. Chemotactic activity of platelet alpha granule proteins for fibroblasts. *J Cell Biol* 1983;96:382-385.
142. Waterfield MD, Scrace GT, Whittle N, Stroobant P, Johnsson A, Wasteson A, Westermark B, Heldin CH, Huang JS, Deuel TF. Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28sis of simian sarcoma virus. *Nature* 1983;304:35-39.
143. Williams LT, Antoniades HN, Goetzl EJ. Platelet-derived growth factor stimulates mouse 3T3 cell mitogenesis and leukocyte chemotaxis through different structural determinants. *J Clin Invest* 1983;72:1759-1763.
144. Huang JS, Huang SS, Deuel TF. Transforming protein of simian sarcoma virus stimulates autocrine growth of SSV-transformed cells through PDGF cell-surface receptors. *Cell* 1984;39:79-87.
145. Bejcek BE, Li DY, Deuel TF. Transformation by v-sis occurs by an internal autoactivation mechanism. *Science* 1989;245:1496-1499.
146. Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 1992;70:31-46.



147. Kim HR, Upadhyay S, Li G, Palmer KC, Deuel TF. Platelet-derived growth factor induces apoptosis in growth-arrested murine fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9500-9504.
148. Deuel TF, Huang JS. Roles of growth factor activities in oncogenesis. *Blood* 1984;64:951-958.
149. Tzeng DY, Deuel TF, Huang JS, Baehner RL. Platelet-derived growth factor promotes human peripheral monocyte activation. *Blood* 1985;66:179-183.
150. Pierce GF, Mustoe TA, Senior RM, Reed J, Griffin GL, Thomason A, Deuel TF. In vivo incisional wound healing augmented by platelet-derived growth factor and recombinant c-sis gene homodimeric proteins. *J Exp Med* 1988;167:974-987.
151. Raff MC, Lillien LE, Richardson WD, Burne JF, Noble MD. Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture. *Nature* 1988;333:562-565.
152. Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Griffin GL, Senior RM, Deuel TF. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol* 1989;109:429-440.
153. Yeh HJ, Ruit KG, Wang YX, Parks WC, Snider WD, Deuel TF. PDGF A-chain gene is expressed by mammalian neurons during development and in maturity. *Cell* 1991;64:209-216.
154. Kim HR, Upadhyay S, Korsmeyer S, Deuel TF. Platelet-derived growth factor (PDGF) B and A homodimers transform murine fibroblasts depending on the genetic background of the cell. *J Biol Chem* 1994;269:30604-30608.
155. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999;79:1283-1316.
156. Joukov V, Kaipainen A, Jeltsch M, Pajusola K, Olofsson B, Kumar V, Eriksson U, Alitalo K. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C. *J Cell Physiol* 1997;173:211-215.
157. Betsholtz C, Karlsson L, Lindahl P. Developmental roles of platelet-derived growth factors. *Bioessays* 2001;23:494-507.
158. LaRochelle WJ, Jeffers M, McDonald WF, Chillakuru RA, Giese NA, Lokker NA, Sullivan C, Boldog FL, Yang M, Vernet C, Burgess CE, Fernandes E, Deegler LL, Rittman B, Shimkets J, Shimkets RA, Rothberg JM, Lichenstein HS. PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nat Cell Biol* 2001;3:517-521.
159. Uutela M, Lauren J, Bergsten E, Li X, Horelli-Kuitunen N, Eriksson U, Alitalo K. Chromosomal location, exon structure, and vascular expression patterns of the human PDGFC and PDGFC genes. *Circulation* 2001;103:2242-2247.

160. Dijkmans J, Xu J, Masure S, Dhanaraj S, Gosiewska A, Geesin J, Sprengel J, Harris S, Verhasselt P, Gordon R, Yon J. Characterization of platelet-derived growth factor-C (PDGF-C): expression in normal and tumor cells, biological activity and chromosomal localization. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:414-426.
161. Bonthron DT, Morton CC, Orkin SH, Collins T. Platelet-derived growth factor A chain: gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:1492-1496.
162. Rorsman F, Bywater M, Knott TJ, Scott J, Betsholtz C. Structural characterization of the human platelet-derived growth factor A-chain cDNA and gene: alternative exon usage predicts two different precursor proteins. *Mol Cell Biol* 1988;8:571-577.
163. Ostman A, Rall L, Hammacher A, Wormstead MA, Coit D, Valenzuela P, Betsholtz C, Westermark B, Heldin CH. Synthesis and assembly of a functionally active recombinant platelet-derived growth factor AB heterodimer. *J Biol Chem* 1988;263:16202-16208.
164. Ostman A, Thyberg J, Westermark B, Heldin CH. PDGF-AA and PDGF-BB biosynthesis: proprotein processing in the Golgi complex and lysosomal degradation of PDGF-BB retained intracellularly. *J Cell Biol* 1992;118:509-519.
165. Heldin CH, Ostman A, Westermark B. Structure of platelet-derived growth factor: implications for functional properties. *Growth Factors* 1993;8:245-252.
166. Bork P. Complement components C1r/C1s, bone morphogenic protein 1 and *Xenopus laevis* developmentally regulated protein UVS.2 share common repeats. *FEBS Lett* 1991;282:9-12.
167. Abedi H, Zachary I. Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration. *Cardiovasc Res* 1995;30:544-556.
168. Abiko Y, Arai J, Matsuzawa K, Inoue T, Shimono M, Kaku T. Human gingival fibroblast migration promoted by platelet-derived growth factor on titanium is correlated with release of urokinase type plasminogen activator. *Bull Tokyo Dent Coll* 1996;37:113-118.
169. Bartold PM, Raben A. Growth factor modulation of fibroblasts in simulated wound healing. *J Periodontal Res* 1996;31:205-216.
170. Dawes KE, Gray AJ, Laurent GJ. Thrombin stimulates fibroblast chemotaxis and replication. *Eur J Cell Biol* 1993;61:126-130.
171. Floege J, Hudkins KL, Seifert RA, Francki A, Bowen-Pope DF, Alpers CE. Localization of PDGF alpha-receptor in the developing and mature human kidney. *Kidney Int* 1997;51:1140-1150.
172. Parenti A, Amerini S, Ledda F, Maggi CA, Ziche M. The tachykinin NK1 receptor mediates the migration-promoting effect of substance P on human

- skin fibroblasts in culture. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1996;353:475-481.
173. Verbeek BS, Vroom TM, Rijksen G. Overexpression of c-Src enhances cell-matrix adhesion and cell migration in PDGF-stimulated NIH3T3 fibroblasts. *Exp Cell Res* 1999;248:531-537.
174. Beckmann MP, Betsholtz C, Heldin CH, Westermark B, Di Marco E, Di Fiore PP, Robbins KC, Aaronson SA. Comparison of biological properties and transforming potential of human PDGF-A and PDGF-B chains. *Science* 1988;241:1346-1349.
175. Clemmons DR, Underwood LE, Van Wyk JJ. Hormonal control of immunoreactive somatomedin production by cultured human fibroblasts. *J Clin Invest* 1981;67:10-19.
176. Clemmons DR, Van Wyk JJ. Evidence for a functional role of endogenously produced somatomedinlike peptides in the regulation of DNA synthesis in cultured human fibroblasts and porcine smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1985;75:1914-1918.
177. Paulsson Y, Hammacher A, Heldin CH, Westermark B. Possible positive autocrine feedback in the prereplicative phase of human fibroblasts. *Nature* 1987;328:715-717.
178. Canalis E. Effect of platelet-derived growth factor on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *Metabolism* 1981;30:970-975.
179. Narayanan AS, Page RC. Biosynthesis and regulation of type V collagen in diploid human fibroblasts. *J Biol Chem* 1983;258:11694-11699.
180. Blatti SP, Foster DN, Ranganathan G, Moses HL, Getz MJ. Induction of fibronectin gene transcription and mRNA is a primary response to growth-factor stimulation of AKR-2B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:1119-1123.
181. Schonherr E, Jarvelainen HT, Sandell LJ, Wight TN. Effects of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 on the synthesis of a large versican-like chondroitin sulfate proteoglycan by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1991;266:17640-17647.
182. Heldin P, Laurent TC, Heldin CH. Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. *Biochem J* 1989;258:919-922.
183. Chua CC, Geiman DE, Keller GH, Ladda RL. Induction of collagenase secretion in human fibroblast cultures by growth promoting factors. *J Biol Chem* 1985;260:5213-5216.
184. Nedelec B, Ghahary A, Scott PG, Tredget EE. Control of wound contraction. Basic and clinical features. *Hand Clin* 2000;16:289-302.

185. Albini A, Pontz B, Pulz M, Allavena G, Mensing H, Muller PK. Decline of fibroblast chemotaxis with age of donor and cell passage number. *Coll Relat Res* 1988;8:23-37.
186. Heckmann M, mann-Grill BC, Hein R, Krieg T. Biphasic effects of interleukin-1 alpha on dermal fibroblasts: enhancement of chemotactic responsiveness at low concentrations and of mRNA expression for collagenase at high concentrations. *J Invest Dermatol* 1993;100:780-784.
187. Mensing H, Pontz BF, Muller PK, Gauss-Muller V. A study on fibroblast chemotaxis using fibronectin and conditioned medium as chemoattractants. *Eur J Cell Biol* 1983;29:268-273.
188. Wach F, Bosserhoff A, Kurzidym U, Nowok K, Landthaler M, Hein R. Effects of mometasone furoate on human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 1998;11:43-51.
189. Leeb SN, Vogl D, Grossmann J, Falk W, Scholmerich J, Rogler G, Gelbmann CM. Autocrine fibronectin-induced migration of human colonic fibroblasts. *Am J Gastroenterol* 2004;99:335-340.
190. Leeb SN, Vogl D, Falk W, Scholmerich J, Rogler G, Gelbmann CM. Regulation of migration of human colonic myofibroblasts. *Growth Factors* 2002;20:81-91.
191. Meier JKH, Leeb SN, Falk W, Scholmerich J, Rogler G. The migratory potential of Crohn's disease myofibroblasts differs significantly between inflamed mucosa, strictures, and fistulae. 124 Suppl. 2 ed. 2003:A-329.
192. Brenmoehl J, Lang M, Hausmann M, Leeb SN, Falk W, Scholmerich J, Goke M, Rogler G. Evidence for a differential expression of fibronectin splice forms ED-A and ED-B in Crohn's disease (CD) mucosa. *Int J Colorectal Dis* 2006.
193. Zeile G, Baake M, Henrici G. *Kompendium der praktischen Hämatologie*. Darmstadt: GIT Verlag Ernst Giebler, 1983.
194. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-580.
195. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 1979;27:1131-1139.
196. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76-85.
197. Lane RD, Federman D, Flora JL, Beck BL. Computer-assisted determination of protein concentrations from dye-binding and bicinchoninic acid protein assays performed in microtiter plates. *J Immunol Methods* 1986;92:261-270.
198. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.

199. Gates RE, King LE, Jr., Hanks SK, Nanney LB. Potential role for focal adhesion kinase in migrating and proliferating keratinocytes near epidermal wounds and in culture. *Cell Growth Differ* 1994;5:891-899.
200. Rieder F, Brenmoehl J, Leeb S, Scholmerich J, Rogler G. Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut* 2007;56:130-139.
201. AbiEzzi SS, Foulk RA, Harwood FL, Akeson WH, Amiel D. Decrease in fibronectin occurs coincident with the increased expression of its integrin receptor  $\alpha 5 \beta 1$  in stress-deprived ligaments. *Iowa Orthop J* 1997;17:102-109.
202. Hu Q, Moerman EJ, Goldstein S. Altered expression and regulation of the  $\alpha 5 \beta 1$  integrin-fibronectin receptor lead to reduced amounts of functional  $\alpha 5 \beta 1$  heterodimer on the plasma membrane of senescent human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res* 1996;224:251-263.
203. van der Pauw MT, Everts V, Beertsen W. Expression of integrins by human periodontal ligament and gingival fibroblasts and their involvement in fibroblast adhesion to enamel matrix-derived proteins. *J Periodontal Res* 2002;37:317-323.
204. Allan A, Wyke J, Allan RN, Morel P, Robinson M, Scott DL, Alexander-Williams J. Plasma fibronectin in Crohn's disease. *Gut* 1989;30:627-633.
205. Fallingborg J, Nielsen D, Pedersen JO. Decreased gelatin-binding fibronectin in patients with chronic inflammatory bowel diseases. *Scand J Gastroenterol* 1985;20:1062-1064.
206. Verspaget HW, Biemond I, Allaart CF, van Weede H, Weterman IT, Gooszen HG, Pena AS, Lamers CB. Assessment of plasma fibronectin in Crohn's disease. *Hepatogastroenterology* 1991;38:231-234.
207. Allan A, Wyke J, Allan RN, Morel P, Robinson M, Scott DL, Alexander-Williams J. Plasma fibronectin in Crohn's disease. *Gut* 1989;30:627-633.
208. Andre C, Descos L, Andre F. Fibronectin level predicts the occurrence of stenosis in patients with Crohn's disease. *Gut* 1984;24:A891-A892.
209. Halliday NL, Rayan GM, Zardi L, Tomasek JJ. Distribution of ED-A and ED-B containing fibronectin isoforms in Dupuytren's disease. *J Hand Surg [Am]* 1994;19:428-434.
210. Van Vliet A, Baelde HJ, Vleming LJ, de Heer E, Bruijn JA. Distribution of fibronectin isoforms in human renal disease. *J Pathol* 2001;193:256-262.
211. Van d, V, Verdaasdonk MA, Rademakers LH, De Weger RA, Van den Tweel JG, Joling P. Fibronectin distribution in human bone marrow stroma: matrix assembly and tumor cell adhesion via  $\alpha 5 \beta 1$  integrin. *Exp Cell Res* 1997;230:111-120.
212. Autschbach F, Giese T, Gassler N, Sido B, Heuschen G, Heuschen U, Zuna I, Schulz P, Weckauf H, Berger I, Otto HF, Meuer SC. Cytokine/chemokine

- messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Virchows Arch* 2002;441:500-513.
213. Stallmach A, Giese T, Schmidt C, Ludwig B, Mueller-Molaian I, Meuer SC. Cytokine/chemokine transcript profiles reflect mucosal inflammation in Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis* 2004;19:308-315.
214. Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res* 2000;257:180-189.
215. Lijnen P, Petrov V, Rumilla K, Fagard R. Transforming growth factor-beta 1 promotes contraction of collagen gel by cardiac fibroblasts through their differentiation into myofibroblasts. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2003;25:79-86.
216. Cordeiro MF, Bhattacharya SS, Schultz GS, Khaw PT. TGF-beta1, -beta2, and -beta3 in vitro: biphasic effects on Tenon's fibroblast contraction, proliferation, and migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:756-763.
217. Berghuis HM, Dieudonne SC, Goei W, Veldhuijzen JP. Effects of TGF-beta 2 on mineral resorption in cultured embryonic mouse long bones; 45Ca release and osteoclast differentiation and migration. *Eur J Orthod* 1994;16:130-137.
218. Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Inflammation location, but not type, determines the increase in TGF-beta1 and IGF-1 expression and collagen deposition in IBD intestine. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:16-26.
219. Thannickal VJ, Lee DY, White ES, Cui Z, Larios JM, Chacon R, Horowitz JC, Day RM, Thomas PE. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 2003;278:12384-12389.
220. Sieg DJ, Hauck CR, Schlaepfer DD. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J Cell Sci* 1999;112 ( Pt 16):2677-2691.
221. Stallmach A, Schuppan D, Riese HH, Matthes H, Riecken EO. Increased collagen type III synthesis by fibroblasts isolated from strictures of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1992;102:1920-1929.
222. Hanaoka K, Tanaka E, Takata T, Miyauchi M, Aoyama J, Kawai N, la-Bona DA, Yamano E, Tanne K. Platelet-derived growth factor enhances proliferation and matrix synthesis of temporomandibular joint disc-derived cells. *Angle Orthod* 2006;76:486-492.
223. Liang M, Wang H, Zhang Y, Lu S, Wang Z. Expression and functional analysis of platelet-derived growth factor in uterine leiomyomata. *Cancer Biol Ther* 2006;5:28-33.
224. Battegay EJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Ross R. TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell* 1990;63:515-524.

225. Elices MJ, Tsai V, Strahl D, Goel AS, Tollefson V, Arrhenius T, Wayner EA, Gaeta FC, Fikes JD, Firestein GS. Expression and functional significance of alternatively spliced CS1 fibronectin in rheumatoid arthritis microvasculature. *J Clin Invest* 1994;93:405-416.
226. Davies JS, Enjalbal C, Wise C, Jones G, Handa BK. Further studies on cyclic RGD analogues. *Biochem Soc Trans* 1994;22:1049-1052.

## 10. Danksagung

Ich möchte allen danken, die am Gelingen dieser Arbeit ihren Anteil hatten:

Prof. Dr. J. Schölmerich für die Ermöglichung dieser Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I.

Prof. Dr. Dr. Gerhard Rogler, der mir stets helfend während der gesamten holprigen Zeit in Regensburg zur Seite stand und auch nach meinem Wegzug aus Regensburg, immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte.

Prof. Dr. C. Aslanidis, der sich bereit erklärt hat, die Betreuung meiner Arbeit zu übernehmen und mir während des gesamten Verfahrens der Promotionseignung sehr half.

Herrn S. Eberl für die phantastische Betreuung hinsichtlich meines langen Weges der Promotion.

Den Ärzten und Kollegen aus der Endoskopie, Chirurgie und Pathologie für die Bereitstellung von Biopsien und Darmgewebe.

Des Weiteren danke ich meinen Kollegen Claudia Hofmann, Manuela Gunckel, Elisabeth Lippert, Florian Schwindler, Katrin Menzel, Christian Huy, Susanne Bentz, Nadja Dunger, Andrea Dirmeier, Susanne Netter, Diane Lochbaum, Jessica Bauer, Nicole Grunwald, Daniela Vogl, Philipp Groß, Lisa Aschenbrenner, Prof. Dr. Werner Falk und allen anderen für ein angenehmes Arbeitsumfeld.



Ganz besonderem Dank verpflichtet bin ich:

Claudia, Manu, Elisabeth, Susanne, Zahnflo, Katrin und Christian, die mir eine sehr schöne finale Zeit in Regensburg beschert und mir somit den Abschied aus Regensburg nicht leicht gemacht haben.

Tom, Lisa, Susi, Maria, Daniel, Andi, Magda, Volker, Marcel und allen anderen des *Rive Droite* für die andere Welt und das zweite „Nicht-Labor-Leben“ in Regensburg.

Meinen Freundinnen Angi, Katja und Yvonne, die trotz kleinerer und größerer Ortsentfernungen stets für mich da waren und sind. Es ist schön, Freundinnen wie euch zu haben!

Meinen Eltern und meinem Bruder, die mich immer unterstützt haben, mir stets gut zusprachen, an mich geglaubt haben und mich oft ermuntern mussten, weiter zu kämpfen.

Meinem Freund Tom für seinen Glauben, seine Gedanken, die Stütze, den Rückenwind und den Auftrieb in den letzten Monaten.

## 11. Anhang

### 11.1 Originalarbeiten

EVIDENCE FOR A DIFFERENTIAL EXPRESSION OF FIBRONEKTIN SPLICE FORMS ED-A AND ED-B IN CROHN'S DISEASE (CD) MUCOSA

**Brenmoehl J**, Lang M, Hausmann M, Leeb SN, Falk W, Scholmerich J, Goke M, Rogler G.  
Int J Colorectal Dis 2006.

WOUND HEALING AND FIBROSIS IN INTESTINAL DISEASE.

Rieder F, **Brenmoehl J**, Leeb S, Scholmerich J, Rogler G.  
Gut 2007;56:130-139.

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF NOD2/CARD15 VARIANTS IN HLA-IDENTICAL SIBLING HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION: EFFECT ON LONG-TERM OUTCOME IS CONFIRMED IN 2 INDEPENDENT COHORTS AND MAY BE MODULATED BY THE TYPE OF GASTROINTESTINAL DECONTAMINATION.

Holler E, Rogler G, **Brenmoehl J**, Hahn J, Herfarth H, Greinix H, Dickinson AM, Socie G, Wolff D, Fischer G, Jackson G, Rocha V, Steiner B, Eissner G, Marienhagen J, Schoelmerich J, Andreesen R.  
Blood 2006;107:4189-4193.

TREATMENT OF STEROID-RESISTANT ACUTE GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE WITH DACLIZUMAB AND ETANERCEPT.

Wolff D, Roessler V, Steiner B, Wilhelm S, Weirich V, **Brenmoehl J**, Leithaeuser M, Hofmeister N, Junghanss C, Casper J, Hartung G, Holler E, Freund M.  
Bone Marrow Transplant 2005;35:1003-1010.

BOTH DONOR AND RECIPIENT NOD2/CARD15 MUTATIONS ASSOCIATE WITH TRANSPLANT-RELATED MORTALITY AND GVHD FOLLOWING ALLOGENEIC STEM CELL TRANSPLANTATION.

Holler E, Rogler G, Herfarth H, **Brenmoehl J**, Wild PJ, Hahn J, Eissner G, Scholmerich J, Andreesen R.  
Blood 2004;104:889-894.

## GENETIC VARIANTS IN THE CARD15 GENE ARE ASSOCIATED WITH EARLY MORTALITY IN SEPSIS PATIENTS

**Brenmoehl J**, Herfarth H, Glück T, Audebert F, Barlage S, Schmitz G, Froehlich D, Schreiber S, Hampe J, Schölmerich J, Holler E, Rogler G

Intensive Care Medicine, In Revision

## MODULATION OF FIBRONECTIN ISOFORM EXPRESSION IN PRIMARY COLONIC LAMINA PROPRIA FIBROBLASTS (CLPF)

**Brenmoehl J**, Falk W, Schölmerich J, Göke M and Rogler G

In Bearbeitung.

## TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA-1 INDUCES INTESTINAL MYOFIBROBLAST DIFFERENTIATION AND HAS A BIPHASIC EFFECT ON CELL MIGRATION

Leeb SN and **Brenmoehl J**, Hofmann C, Vogl D, Falk W, Schölmerich J, Rogler G

In Bearbeitung.

## 11.2 Veröffentlichte Abstracts

Digestive Disease Week 2004, New Orleans

### EXPRESSION OF FIBRONECTIN SPLICING-FORMS ED-A AND ED-B DIFFERS IN STRICTURES, FISTULAE AND INFLAMMATION IN CROHN'S DISEASE (CD) MUCOSA

**Brenmoehl J**, Lang M, Hausmann M, Leeb SN, Falk W, Schölmerich J, Göke M, Rogler G.

*Gastroenterology* 124 Suppl. 1, A-331 (2003)

58. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten 2003, Nürnberg

### DIE EXPRESSION DER FIBRONEKTIN SPLICING FORMEN ED-A UND ED-B IST IN DER MUKOSA VON PATIENTEN MIT MORBUS CROHN (MC) REDUZIERT

**Brenmoehl J**, Lang M, Hausmann M, Leeb SN, Falk W, Schölmerich J, Göke M, Rogler G

*Z Gastroenterol* 2003; 41;761

Digestive Disease Week 2004, New Orleans

EXPRESSION OF FIBRONECTIN SPLICING-FORMS ED-A AND ED-B DIFFERS IN STRICTURES, FISTULAE AND INFLAMMATION IN CROHN'S DISEASE (CD) MUCOSA

**Brenmoehl J**, Lang M, Hausmann M, Leeb SN, Falk W, Scholmerich J, Göke M, Rogler G.  
*Gastroenterology* 126 (Suppl )

59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten 2004, Leipzig

DIE EXPRESSION DER FIBRONEKTIN SPLICING FORMEN ED-A UND ED-B IST IN DER MUKOSA VON PATIENTEN MIT MORBUS CROHN (MC) REDUZIERT

**Brenmoehl J**, Lang M, Hausmann M, Leeb SN, Falk W, Scholmerich J, Göke M, Rogler G  
*Z Gastroenterol* 2004; 42;838

Digestive Disease Week 2005, Chicago

PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES MODULATE FIBRONECTIN ISOFORM EXPRESSION IN PRIMARY COLONIC LAMINA PROPRIA FIBROBLASTS (CLPFs)

**Brenmoehl J**, Leeb SN, Falk W, Schölmerich J, Göke M, Rogler G  
*Gastroenterology* 128 (Suppl 2) A-211: S1414

60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten 2005, Köln;

PROINFLAMMATORISCHE ZYTOKINE MODULIEREN DIE FIBRONEKTIN ISOFORM EXPRESSION IN PRIMÄREN DARM-FIBROBLASTEN

**Brenmoehl J**, Leeb SN, Falk W, Schölmerich J, Göke M, Rogler G;  
*Z Gastroenterol* 2005; 43;791

Digestive Disease Week 2006, Los Angeles

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF NOD2/CARD15 SNPs IN ALLOGENEIC STEM CELL TRANSPLANTATION (SCT) OF HLA-IDENTICAL SIBLINGS FROM UNRELATED DONORS

**Brenmoehl J**, Leeb SN, Falk W, Schölmerich J, Göke M, Rogler G  
*Gastroenterology* 130 (Suppl )

61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten 2006, Hannover;

NOD2/CARD15 MUTATIONEN SIND ASSOZIIERT MIT  
TRANSPLANTATIONSBEDINGTER MORTALITÄT UND GVHD BEI HLA-  
IDENTISCHEN GESCHWISTERN: DETAILIERTE ANALYSE VON EINZELNEN  
SNPs BEI 312 PATIENTEN/SPENDER-PAAREN

**Brenmoehl J**, Dickinson AM, Finke J, Greinix H, Socie G, Wolff D, Jackson G, Fischer G, Rocha V, Steiner B, Hahn J, Bremm H, Hildebrandt G, Eissner G, Marienhagen J, Schoelmerich J, Andreesen R, Holler E, Rogler G

*Z Gastroenterol* 2006; 44;711

### 11.3 Weitere Kongressbeiträge

Inflammatory Diseases of Barrier Organs, International Symposium 2005, Kiel;  
GENETIC VARIANTS IN THE NOD2/CARD15 GENE ARE ASSOCIATED WITH  
EARLY SEPSIS AND TRANSPLANTATION RELATED MORTALITY

**Brenmoehl J**, Herfarth H, Glück T, Audebert F, Barlage S, Schmitz G, Froehlich D, Schreiber S, Hampe J, Hahn J, Eissner G, Dickinson AM, Jackson G, Greinix H, Fischer G, Wolff D, Steiner B, Marienhagen J, Andreesen R, Schölmerich J, Holler E, Rogler G

4th International Meeting on Inflammatory Bowel Diseases "On the way to new  
therapies" 2006, Capri

NOD2/CARD15 MUTATIONS ASSOCIATE WITH TRANSPLANT RELATED  
MORTALITY AND GVHD IN HLA-IDENTICAL SIBLING TRANSPLANTS: DETAILED  
ANALYSIS OF SINGLE SNPs IN 312 RECIPIENT/DONOR PAIRS

**Brenmoehl J**, Dickinson AM, Finke J, Greinix H, Socie G, Wolff D, Jackson G, Fischer G, Rocha V, Steiner B, Hahn J, Bremm H, Hildebrandt G, Eissner G, Marienhagen J, Schoelmerich J, Andreesen R, Holler E, Rogler G

## **11.4 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Mitteln erstellt habe.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Julia Brenmoehl